

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DO *Pediococcus acidilactici* B14 QUANTO ÀS
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM *Lactobacillus*
acidophilus ATCC 4356 COM APLICAÇÃO EM SOBREMESA COM SOJA
AERADA POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA**

CURITIBA

2012

MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DO *Pediococcus acidilactici* B14 QUANTO ÀS
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM *Lactobacillus*
acidophilus ATCC 4356 COM APLICAÇÃO EM SOBREMESA COM SOJA
AERADA POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia,
Setor de Tecnologia, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra. Luciana Porto de Souza
Vandenberghe

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientadora: Profª Dra. Michele Rigon Spier

CURITIBA

2012

Com muito amor e carinho, dedico....
Aos meus pais, meu alicerce
A Jocelito, minha força
A Pedro, minha vida

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida maravilhosa que me concedeu.

Ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná por disponibilizar os recursos para a concretização deste projeto.

À Profª Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, pela confiança em mim depositada, pela sua paciência e serenidade na condução deste trabalho e pelo exemplo de profissional, o meu reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela ideia inicial do trabalho.

À Profª Dra. Michele Rigon Spier pelas sugestões valiosas, atenção e docilidade, obrigada.

As minhas amigas Profª Dra. Denise Milléo Almeida e Profª Dra. Giovana Arruda Moura Pietrowski, maiores incentivadoras deste trabalho, obrigada pelos ensinamentos e pelo apoio nesta caminhada. A participação de vocês foi muito importante para esta conquista!

Aos colegas de departamento, Prof. Ms. Luiz Alberto Chavéz Ayala, Prof. Dr. José Luiz Ferreira da Trindade e Profª Dra. Maria Helene Canteri, que possibilitaram a realização deste trabalho assumindo as minhas aulas.

Aos colegas Profª Dra. Katia Sabrina Paludo, Prof. Dr. Luís Antônio Pinheiro, Profª Dra. Rosilene Prestes, Prof. Ms. Selaucio Vorubi Júnior, Prof. Dr. Ivo Motim Demiate, Profª Dra. Elza Louko Ida, Profª Dra. Nelci Catarina Chiquetto, Profª Dra. Sônia Pileggi, Profª Dra. Juliana Vitória Bittencourt, Profª Vanete Thomaz Soccol, Prof. Dr. Alessandro Nogueira, Profª Dra. Deise Rosana Simões, a Ms. Tatiane Gomes, ao Ms. Sidnei Bordignon Júnior e ao Dr. Gustavo Henrique Couto que contribuíram para a realização deste projeto.

Aos estagiários que auxiliaram durante todo o período de doutorado: Gabriela Sartori, Rafaela Gorski, Franciele Casanova Monteiro, Priscila Judeski, Tatiane Boveroti, Andresa Fragoso, Suelyn Nigelski e Lilian Taques Almeida, obrigada pela valiosa ajuda.

Aos meus tios Marcos e Sandra, Paulo e Lair que me acolheram em suas casas por tantas vezes, obrigada.

Aos meus pais João e Mariza, pelo amor incondicional, pelas palavras de apoio e incentivo e por cuidar do amor da minha vida, Pedro, quando eu não podia, obrigada.

Ao Jocelito, pela sua compreensão nos muitos momentos de minha ausência, pela sua força nos momentos das minhas dificuldades e pela sua alegria com as minhas conquistas, obrigada.

A minha família.

“A luz que acende o olhar vem das estrelas no meu coração,
vem de uma força que me fez assim, vem das palavras,
lembranças e flores regadas em mim.... vem do infinito,
da estrela cadente, do espelho da alma, dos filhos da gente,
de algum lugar, só pra iluminar...a força vem de onde eu venho,
de tudo que acende e a vida calada me olha e entende
o que eu sou, tudo o que é maior vem do amor,
vem do amor...”

autor desconhecido

RESUMO

As matérias-primas de origem vegetal podem representar fontes seguras de bactérias ácido lácticas com propriedades particulares. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar quanto ao potencial probiótico à bactéria ácido láctica *Pediococcus acidilactici* B14, isolada de matéria-prima de origem vegetal, para empregar em cultura associada no desenvolvimento de sobremesa com soja aerada, potencialmente simbiótica. Inicialmente, foram empregadas 10 fontes de matérias-primas vegetais para o isolamento, dos 63 isolados obtidos apenas 13 foram selecionados como bactérias ácido lácticas. Somente 4 das culturas selecionadas não foram classificadas presuntivamente como enterococos e não apresentaram atividade hemolítica. Estas cepas foram avaliadas quanto a vários aspectos, de forma a verificar a capacidade de utilização como cultura *starter* no processamento de alimentos. Estes cultivos foram submetidos à identificação molecular obtendo índice de confirmação de 96,35, 82,4, 93,0% como *Pediococcus acidilactici*, apenas para uma estirpe a identificação não foi conclusiva quanto à espécie. A espécie de *Pediococcus acidilactici* que apresentou maior índice de confirmação foi obtida do fruto do baru (*Dipteryx alata*), esta cepa foi avaliada quanto ao seu potencial probiótico apresentando resultados como tolerância aos antimicrobianos cefalexina, cefotaxima, neomicina, penicilina G e vancomicina e inibição de alguns patógenos. A capacidade de adesão *in vitro* foi de 64 bactérias/ 100 células HRT-18 de adenocarcinoma humano e ao ser submetida ao trânsito gastrointestinal simulado *in vitro*, apresentou 65,82 e 97,45% de sobrevivência quando o suco gástrico foi mantido em pH 2,0 e 4,0, respectivamente. Quando associada com o *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, com o qual não apresentou antagonismo, obteve taxa máxima de crescimento de 0,513 h⁻¹ em 10 h e 0,416 g.L⁻¹.h⁻¹ de produtividade em ácido láctico em 48 h de fermentação, o índice de sobrevivência nas mesmas condições simuladas do trato gastrointestinal foi de 57,28% (pH 2,0) e 92,39% (pH 4,0). Esta cultura associada foi considerada potencialmente probiótica e quando adicionada em sobremesa com soja aerada prebiótica, como matriz alimentar, originou um produto potencialmente simbiótico. A sobremesa foi submetida ao armazenamento refrigerado (4±1°C) por 28 dias, sendo avaliada a cada 7 dias. Durante este período de estocagem apresentou população celular de 9,82 a 9,26 log UFC.120g⁻¹, estando o produto adequado a legislação vigente. A presença da matriz alimentar promoveu um aumento de 10,00 e 5,68% na viabilidade celular da cultura associada, em comparação a sua forma livre, quando submetida ao trânsito gastrointestinal nas condições de pH 2,0 e 4,0, respectivamente. As sobremesas de 1 e 28 dias de armazenamento se apresentaram adequadas, segundo a legislação vigente, quanto ao aspecto sanitário e sem diferença significativa para o atributo acidez, a aceitabilidade e preferência. O custo final de fabricação estimado foi de R\$ 2,12 para a porção de 120 g de sobremesa. Embora o setor de alimentos funcionais apresente forte tendência de crescimento, no Brasil e no mundo, o desenvolvimento e a inovação destes produtos estão atrelados a escolha ideal do par linhagem probiótica e matriz alimentar, seleção esta, que demanda tempo e exaustiva investigação.

Palavras-chave: Matérias-primas vegetais; Bactérias ácido lácticas; *Pediococcus acidilactici*; Probiótico; Sistema Gastrointestinal; Sobremesa com soja aerada;

ABSTRACT

Raw materials originating from plants may represent safe sources of lactic bacteria with specific properties. Consequently, the aim of this study was to characterize the probiotic potential of the lactic bacteria *Pediococcus acidilactici* B14, isolated from raw material of plant origin, for use in associated culture in the development of potentially synbiotic, aerated soy dessert. Initially, 10 sources of plant raw material were used for the isolation of the lactic bacteria; of the 63 that had been potentially identified only 13 were selected as lactic bacteria. Only 4 of the selected cultures were not classified as presumptive enterococci and showed no hemolytic activity. These strains were evaluated for various aspects in order to verify their ability to be used as a starter culture in food processing. These cultures were subjected to molecular identification, obtaining a confirmation index of 96.35, 82.4, and 93.0% as *Pediococcus acidilactici*. The identity of the species was inconclusive in the case of only one lineage. The species of *Pediococcus acidilactici* that presented the highest confirmation index was obtained from *baru* fruit (*Dipteryx alata*), and this strain was evaluated for its probiotic potential, presenting results such as tolerance to the antibiotics cephalixin, cefotaxime, neomycin, penicillin G and vancomycin, as well as the inhibition of some pathogens. The *in vitro* adhesion capacity was 64 bacteria/100 HRT-18 cells of human adenocarcinoma, and when subjected to simulated *in vitro* gastrointestinal transit, the figures were 65.82 and 97.45% survival, while the gastric juice was maintained at 2.0 and 4.0 pH, respectively. When associated with *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, with which it showed no antagonism, it obtained a maximum growth rate of 0.513 h^{-1} in 10 h and $0.416 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ productivity in lactic acid in 48 h of fermentation; the rate of survival under the same simulated conditions in the gastrointestinal tract was 57.28% (pH 2.0) and 92.39% (pH 4.0). This associated culture was considered to be potentially probiotic, and when it was added to aerated dessert with prebiotic soybeans as a food matrix, a potentially synbiotic was produced. The dessert was subjected to cold storage ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) for 28 days and evaluated every 7 days. During this storage period it showed a cell population of 9.82 to 9.26 log UFC 120g^{-1} , which meets the demands of current legislation. The presence of the food matrix promoted an increase of 10.00 and 5.68% in the cell viability of the associated culture, compared to its free form, when subjected to gastrointestinal transit under the conditions of 2.0 and 4.0 pH, respectively. After 1 and 28 days of storage, the desserts were adequate, according to current legislation regarding sanitary standards and there was no significant difference regarding acidity, acceptability and preference. The final cost of production was estimated at R\$ 2.12 for a 120 g serving of dessert. Although the functional food sector shows strong growth trend in Brazil and worldwide, the development and innovation of these products are linked to the choice pair probiotic strain and the food matrix, this selection, time-consuming and exhaustive investigation.

Keywords: Vegetal raw materials; Lactic bacteria; *Pediococcus acidilactici*; Probiotic; Gastrointestinal system; Aereated soya dessert.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 3.1 VARIAÇÃO DO pH.....	79
EQUAÇÃO 3.2 VELOCIDADE DE ACIDIFICAÇÃO.....	79
EQUAÇÃO 4.1 POPULAÇÃO CELULAR.....	107
EQUAÇÃO 4.2 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	108
EQUAÇÃO 4.3 TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	114
EQUAÇÃO 4.4 PRODUTIVIDADE EM PRODUTO.....	115
EQUAÇÃO 5.1 POPULAÇÃO CELULAR.....	145
EQUAÇÃO 5.2 DENSIDADE INICIAL.....	149
EQUAÇÃO 5.3 DENSIDADE DO SISTEMA AERADO.....	149
EQUAÇÃO 5.4 VOLUME ESPECÍFICO DO SISTEMA AERADO.....	149
EQUAÇÃO 5.5 CONTEÚDO DE AR INCORPORADO.....	149
EQUAÇÃO 5.6 OVERRUN.....	149
EQUAÇÃO 5.7 CROMA.....	154
EQUAÇÃO 5.8 ÂNGULO <i>HUE</i>	155
EQUAÇÃO 5.9 VARIAÇÃO DA COR.....	155
EQUAÇÃO 5.10 VALOR TOTAL DA MATÉRIA-PRIMA.....	157
EQUAÇÃO 5.11 VALOR POR UNIDADE DE PRODUTO.....	157

GRÁFICOS

GRÁFICO 3.1 CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO DAS CULTURAS SELECIONADAS, REPRESENTADA PELA ACIDEZ.....	91
GRÁFICO 3.2 TEOR DE L-TIROSINA LIBERADO DEVIDO À PROTEÓLISE DA CASEÍNA, PELAS CULTURAS, DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	93
GRÁFICO 4.1 VIABILIDADE DO <i>P. acidilactici</i> B14 EM PRESENÇA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, DURANTE 360 MINUTOS.....	118
GRÁFICO 4.2 TOLERÂNCIA DO <i>P. acidilactici</i> B14 FRENTE AOS SAIS BILIARES.....	119
GRÁFICO 4.3 RESISTÊNCIA DO <i>P. acidilactici</i> B14 AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO <i>IN VITRO</i>	124

GRÁFICO 4.4 CURVA DE CRESCIMENTO EM CALDO MRS, SISTEMA ESTÁTICO, A 37±1°C, DURANTE 12 HORAS.....	128
GRÁFICO 4.5 CURVA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO EM SISTEMA ESTÁTICO.....	129
GRÁFICO 4.6 CURVA DE ACIDIFICAÇÃO NO EXTRATO AQUOSO DE SOJA, EXPRESSA EM ACIDEZ TOTAL.....	130
GRÁFICO 4.7 CURVA DE ACIDIFICAÇÃO NO EXTRATO AQUOSO DE SOJA, EXPRESSA NO pH.....	131
GRÁFICO 4.8 RESISTÊNCIA DA CULTURA ASSOCIADA AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO <i>IN VITRO</i>	132
GRÁFICO 5.1 VIABILIDADE DA CULTURA ASSOCIADA NA SOBREMESA, DURANTE 28 DIAS SOB TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO.....	165
GRÁFICO 5.2 VIABILIDADE CELULAR DA CULTURA ASSOCIADA NA SOBREMESA, FRENTE AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO EM CONDIÇÃO DE pH 2,0.....	167
GRÁFICO 5.3 VIABILIDADE CELULAR DA CULTURA ASSOCIADA NA SOBREMESA, FRENTE AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO EM CONDIÇÃO DE pH 4,0.....	168
GRÁFICO 5.4 DISTRIBUIÇÃO DAS NOTAS DOS JULGADORES PARA A ACEITABILIDADE.....	179

QUADROS

QUADRO 2.1 PRINCIPAIS PROPRIEDADES DOS GÊNEROS DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS..	27
QUADRO 2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS E PRINCIPAIS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ENVOLVIDAS.....	29
QUADRO 2.3 CEPAS DE <i>Pediococcus</i> E SEUS HABITATS.....	30
QUADRO 2.4 PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS.....	37
QUADRO 2.5 CRITÉRIOS FUNDAMENTAIS E DESEJÁVEIS PARA SELEÇÃO DE PROBIÓTICOS EM APLICAÇÕES COMERCIAIS.....	39
QUADRO 2.6 ALGUNS EFEITOS BENÉFICOS, ESTABELECIDOS E POTENCIAIS, PARA ORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	40
QUADRO 2.7 EXEMPLOS DE PRODUTOS QUE CONTÉM CULTURAS ASSOCIADAS.....	45
QUADRO 2.8 CONSTITUINTES PRESENTES NA SOJA, COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS GRUPOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E GÊNEROS GRAM-POSITIVOS.....	24
FIGURA 2.2 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE PARTE DO METABOLISMO PRIMÁRIO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	25

FIGURA 2.3 DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO SISTEMA DIGESTÓRIO.....	36
FIGURA 2.4 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS MECANISMOS POTENCIAIS E CONHECIDOS DOS PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA.....	41
FIGURA 2.5 ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA INULINA E OLIGOFRUTOSE.....	49
FIGURA 2.6 ESTRUTURA QUÍMICA DAS ISOFLAVONAS EM SUAS FORMAS: (A) GLICOSILADA E (B) AGLICONA.....	55
FIGURA 3.1 SEQUENCIA EMPREGADA, DO ISOLAMENTO DOS CULTIVOS ATÉ A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	74
FIGURA 3.2 IMAGEM ILUSTRATIVA DOS HALOS CARACTERÍSTICOS DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	77
FIGURA 3.3 ESTIRPE COM ATIVIDADE β -HEMOLÍTICA.....	88
FIGURA 3.4 A) BANDAS QUE IDENTIFICAM A PRESENÇA DE DNA CROMOSSOMAL EXTRAÍDO DAS CULTURAS AC1, B14, B16 E B17 E O MARCADOR MOLECULAR B) BANDAS QUE IDENTIFICAM OS PRODUTOS AMPLIFICADOS DA PCR DOS ISOLADOS AC1, B14, B16 E B17 E O MARCADOR MOLECULAR.....	94
FIGURA 4.1 ETAPAS DA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA RESISTÊNCIA DA CULTURA AO SISTEMA GASTROINTESTINAL.....	111
FIGURA 4.2 CULTURA DE <i>P. acidilactici</i> B14 E O PATÓGENO <i>S. aureus</i> ATCC 6538P, EM MEIO TAMPONADO.....	122
FIGURA 4.3 IMAGEM OBTIDA DA ADESÃO DA BACTÉRIA <i>P. acidilactici</i> B14 EM CÉLULAS HRT-18.....	126
FIGURA 5.1 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DA SOBREMESA COM SOJA AERADA, POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA.....	148
FIGURA 5.2 ESQUEMA ILUSTRADO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR NA SOBREMESA.....	151
FIGURA 5.3 ESQUEMA ILUSTRADO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA RESISTÊNCIA AO SISTEMA GASTROINTESTINAL.....	152
FIGURA 5.4 IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA, SOB CAMPO ESCURO, DA SOBREMESA AERADA COM 1 E 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO.....	162
FIGURA 5.5 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ESTRUTURA DA SOBREMESA AERADA, COM 1 E 28 DIAS DE CONSERVAÇÃO REFRIGERADA.....	163

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, DE VITAMINAS E MINERAIS DO EXTRATO DE SOJA EM PÓ E DO EXTRATO AQUOSO DE SOJA.....	54
TABELA 3.1 NÚMERO TOTAL DE ISOLADOS E DE CEPAS SELECIONADAS COMO BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	85
TABELA 3.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS CULTURAS SELECIONADAS.....	86
TABELA 3.3 CAPACIDADE DE CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE CLORETO E NITRITO DE SÓDIO.....	89
TABELA 3.4 VARIAÇÃO DO pH OBTIDA DURANTE O PERÍODO DE FERMENTAÇÃO.....	90
TABELA 3.5 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA OBTIDA PELA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	95
TABELA 4.1 COMPORTAMENTO DA CEPA DO <i>P. acidilactici</i> EM PRESENÇA DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS.....	120
TABELA 4.2 EFEITO ANTAGONISTA DO <i>P. acidilactici</i> B14 EM PRESENÇA DE PATÓGENOS....	123
TABELA 5.1 INGREDIENTES DA FORMULAÇÃO DA SOBREMESA COM SOJA AERADA DESENVOLVIDA.....	146
TABELA 5.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA QUANTO AO ASPECTO SANITÁRIO DA SOBREMESA.....	170
TABELA 5.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS APRESENTADAS PELA SOBREMESA DURANTE PERÍODO DE ARMAZENAMENTO.....	171
TABELA 5.4 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DA SOBREMESA DURANTE O TEMPO DE ESTOCAGEM.....	173
TABELA 5.5 COMPOSIÇÃO DE ISOFLAVONAS NO EXTRATO DE SOJA E NA SOBREMESA.....	175
TABELA 5.6 INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DA SOBREMESA COM SOJA AERADA POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA.....	177
TABELA 5.7 ANÁLISE SENSORIAL DA SOBREMESA COM SOJA AERADA POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA.....	178
TABELA 5.8 DESCRIÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA FABRICAÇÃO DA SOBREMESA...	180

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Water Activity
AC	Água de Côco
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AP	Amora-Preta
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B	Baru
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
BHI	<i>Brain Heart Infusin</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C	Citosina
CC	Café Cereja
CIE	<i>Commision Internationale de L' Eclairage</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUAE	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
CNNPA	Comissão Nacional Normas para Alimentos
CPS	Concentrado Protéico de Soro
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
D-LDH	D-lactato desidrogenase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EAS	Extrato Aquoso de Soja
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EM	Erva Mate
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Folha de Erva Mate

FOS	Fruto-oligossacarídeos
G	Guabiroba
G	Guanina
GP	Grau de Polimerização
GPT	Glutamato Piruvato-Transaminase
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
IL-10	Interleucina-10
INRA	<i>Institut Nacional de La Recherche Agronomique</i>
LDR	Leite Desnatado Reconstituído
L-LDH	L-Lactato Desidrogenase
M	Maçã
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
MS	Ministério da Saúde
MSOP	<i>Modification of a Salting-Out Procedure</i>
N	Nêspera
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PP	Polipropileno
PVC	Policloreto de Polivinila
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribossômico
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
SG	Suco Gástrico
SGI	Sistema Gastrointestinal
SI	Suco Intestinal
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGI	Trato Gastrointestinal

UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UJ	Uva Japonesa
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Conteúdo de ar incorporado
ε	Coeficiente de extinção do NADH d-trajetória óptica
ρ_0	Densidade inicial
Δa^*	Variação de a^*
Δb^*	Variação de b^*
ΔDO	Variação da densidade óptica entre amostra e branco
ΔE^*_{ab}	Variação da cor da amostra em determinado intervalo de tempo
ΔL^*	Variação da luminosidade
ΔpH	Variação do pH
ρ_{sa}	Densidade do sistema aerado
μ	Taxa específica de crescimento microbiano
a^*	Coloração na região do vermelho(+) ao verde(-)
b^*	Coloração no intervalo do amarelo (+) ao azul (-)
C^*	Croma
C_{AL}	Concentração de ácido láctico
D	Diluição
H^*	Ângulo <i>Hue</i>
m_0	Massa inicial (produto não batido)
m_{sa}	Massa do sistema aerado (produto batido)
NC	Número de colônias contadas
P_0	Produção inicial
PC	População celular
pH	pH do tempo de fermentação
pH_0	pH do tempo inicial
P_m	Produção média referente ao tempo total ou final da fermentação
PM	Peso molecular do ácido láctico
P_p	Produtividade em produto
Q_{PF}	Quantidade que se deseja produzir do produto final
Q_T	Quantidade teórica da matéria-prima

Q_U	Quantidade unitária do produto final
t	Tempo
t_0	Tempo inicial
t_f	Tempo final da fermentação
V	Volume total do ensaio
v	Volume da amostra
V_0	Volume inicial
$V_{acidificação}$	Velocidade de acidificação
$V_{esp.}$	Volume específico do sistema aerado
V_{sa}	Volume do sistema aerado
V_T	Valor total da matéria-prima
V_U	Valor unitário da matéria-prima
V_{UP}	Valor por unidade de produto

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	19
1	INTRODUÇÃO.....
2	OBJETIVOS.....
2.1	OBJETIVO GERAL.....
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....
3	ENCAMINHAMENTOS DO TRABALHO.....
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	23
1	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS.....
1.2	PRINCIPAIS APLICAÇÕES.....
1.3	GÊNERO <i>Pediococcus</i>
1.4	GÊNERO <i>Lactobacillus</i>
2	PROBIÓTICOS.....
2.1	GENERALIDADES SOBRE A MICROBIOTA GASTROINTESTINAL.....
2.2	DEFINIÇÃO E ORIGEM.....
2.3	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS PROBIÓTICOS.....
2.4	EFEITOS BENÉFICOS E MECANISMOS PROPOSTOS.....
3	ASSOCIAÇÃO DE CULTURAS LÁTICAS.....
4	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....
5	INGREDIENTES ALIMENTARES COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....
5.1	INULINA E OLIGOFRUTOSE.....
5.2	CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE.....
5.3	EXTRATO DE SOJA.....
	REFERÊNCIAS.....
CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS E SELECIONADAS DE MATÉRIAS PRIMAS DE ORIGEM VEGETAL.....	70
1	INTRODUÇÃO.....
2	MATERIAL E MÉTODOS.....
2.1	MATERIAIS.....
2.2	MÉTODOS.....
2.2.1	Isolamento dos cultivos.....
2.2.2	Recuperação das culturas.....
2.2.3	Manutenção das culturas.....
2.2.4	Seleção dos cultivos.....
2.2.5	Caracterização fisiológica dos cultivos selecionados.....
2.2.5.1	Característica de fermentação da glicose.....
2.2.5.2	Pesquisa presuntiva de enterococos.....
2.2.5.3	Pesquisa de fatores de patogenicidade.....
2.2.6	Propriedades de interesse tecnológico dos cultivos selecionados.....
2.2.6.1	Crescimento em presença de cloreto e nitrito de sódio.....
2.2.6.2	Capacidade de acidificação.....
2.2.6.3	Capacidade de hidrólise da caseína.....
2.2.7	Identificação molecular.....
2.2.7.1	Extração do DNA.....
2.2.7.2	Amplificação.....
2.2.7.3	Seqüenciamento.....
2.2.8	Análise estatística.....
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....
3.1	CARACTERÍSTICAS DOS CULTIVOS ISOLADOS E SELECIONADOS.....
3.2	CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DOS CULTIVOS SELECIONADOS.....
3.3	PROPRIEDADES DE INTERESSE TECNOLÓGICO DOS CULTIVOS SELECIONADOS.....

3.3.1	Resistência ao cloreto e nitrito de sódio.....	88
3.3.2	Capacidade de acidificação.....	90
3.3.3	Capacidade de hidrólise da caseína.....	92
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS CULTIVOS SELECIONADOS.....	94
4	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98

CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DA CEPA *Pedococcus acidilactici* B14 E DESENVOLVIMENTO DA CULTURA ASSOCIADA COM *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.....

		102
1	INTRODUÇÃO.....	103
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1	MATERIAIS.....	106
2.2	MÉTODOS.....	106
2.2.1	Manutenção das culturas.....	106
2.2.2	Método microbiológico para contagem celular.....	107
2.2.3	Avaliação das propriedades probióticas do <i>P. acidilactici</i> B14.....	107
2.2.3.1	Determinação da concentração do ácido láctico.....	107
2.2.3.2	Avaliação da resistência ao pH ácido e sais biliares.....	108
2.2.3.3	Avaliação da resistência aos antibióticos.....	109
2.2.3.4	Determinação da resistência frente à patógenos.....	109
2.2.3.5	Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal.....	110
2.2.3.6	Avaliação da capacidade de adesão.....	112
2.2.4	Desenvolvimento da cultura associada.....	112
2.2.4.1	Determinação da cultura associada.....	113
2.2.4.2	Avaliação das características do crescimento.....	113
2.2.4.3	Avaliação da produção de ácido láctico.....	114
2.2.4.4	Capacidade de acidificação e extrato aquoso de soja.....	115
2.2.4.5	Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal.....	116
2.2.5	Análise estatística.....	116
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
3.1	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DO <i>P. acidilactici</i> B14.....	117
3.1.1	Determinação da concentração do ácido láctico.....	117
3.1.2	Avaliação da resistência ao pH ácido e sais biliares.....	117
3.1.3	Avaliação da resistência aos antibióticos.....	120
3.1.4	Determinação da resistência frente à patógenos.....	121
3.1.5	Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal.....	124
3.1.6	Avaliação da capacidade de adesão.....	125
3.2	DESENVOLVIMENTO DA CULTURA ASSOCIADA.....	127
3.2.1	Determinação da cultura associada.....	127
3.2.2	Avaliação das características do crescimento.....	127
3.2.3	Avaliação da produção de ácido láctico.....	128
3.2.4	Capacidade de acidificação em extrato aquoso de soja.....	129
3.2.5	Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal.....	131
4	CONCLUSÕES.....	134
	REFERÊNCIAS.....	135

CAPÍTULO V – APLICAÇÃO DA CULTURA ASSOCIADA DE *Pedococcus acidilactici* B14 E *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 PARA OBTENÇÃO DE SOBREMESA COM SOJA AERADA, POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA.....

		140
1	INTRODUÇÃO.....	141
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	144
2.1	MATERIAIS.....	144
2.1.1	Culturas e ingredientes.....	144
2.2	MÉTODOS.....	145
2.2.1	Manutenção das culturas.....	145
2.2.2	Método microbiológico para contagem celular.....	145
2.2.3	Preparo da cultura láctica associada.....	145

2.2.4	Obtenção da sobremesa aerada.....	146
2.2.5	Avaliação das características da sobremesa aerada.....	149
2.2.5.1	Características físicas.....	149
2.2.5.2	Características microscópicas.....	150
2.2.5.3	Características microbiológicas.....	151
2.2.5.3.1	Viabilidade celular da cultura associada.....	151
2.2.5.3.2	Resistência ao sistema gastrointestinal.....	151
2.2.5.3.3	Características sanitárias.....	153
2.2.5.4	Características químicas.....	153
2.2.5.4.1	Características físico-químicas.....	153
2.2.5.4.2	Características cromáticas.....	154
2.2.5.4.3	Características da composição de isoflavonas.....	155
2.2.5.5	Rotulagem nutricional.....	156
2.2.5.6	Características sensoriais.....	157
2.2.5.7	Estimativa de custo.....	157
2.2.6	Análise estatística.....	158
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	159
3.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....	159
3.2	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	160
3.3	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	164
3.3.1	Viabilidade celular da cultura associada.....	164
3.3.2	Resistência ao sistema gastrointestinal.....	166
3.3.3	Características sanitárias.....	170
3.4	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	171
3.4.1	Características físico-químicas.....	171
3.4.2	Características cromáticas.....	172
3.4.3	Características da composição de isoflavonas.....	174
3.5	ROTULAGEM NUTRICIONAL.....	176
3.6	CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS.....	178
3.7	ESTIMATIVA DE CUSTO.....	179
4	CONCLUSÕES.....	182
	REFERÊNCIAS.....	183
	ANEXOS	
	APÊNDICES	
CAPÍTULO VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		189
1	CONCLUSÕES	189
2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	192

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

As matérias-primas de origem vegetal, devido às variadas condições ambientais em que estão inseridas, além das características intrínsecas a cada espécie, representam um *habitat* ainda pouco explorado, no que se refere à microbiota lática.

Embora alguns relatos na literatura afirmem que esta biota é limitada, quando comparada com a diversidade presente nas cavidades internas de humanos e animais e em alimentos como leite e carne, cepas de gêneros como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, entre outros, tem sido encontrados em vegetais.

Devido a características como a alta exigência nutricional, temperatura média de 37°C e a condição de oxigênio requerida para o crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL), as torna comum em ambientes como o trato gastrointestinal e em produtos ricos nutricionalmente como o leite e a carne. Entretanto, nos vegetais e nos ambientes em que se encontram, muitas vezes podem ser observadas situações inóspitas como grandes oscilações de temperatura, resíduos de defensivos agrícolas e promotores de crescimento, acidez elevada e algumas substâncias que podem inibir a atividade metabólica dos micro-organismos.

O fato de se encontrar BAL em ambientes adversos permite considerar que estes micro-organismos possivelmente tenham desenvolvido mecanismos de resistência para sobreviver em tais condições o que as torna interessantes para a investigação quanto ao seu potencial probiótico.

As linhagens de micro-organismos que apresentam propriedades potencialmente probióticas devem ser exaustivamente investigadas, por ensaios *in vitro* e principalmente *in vivo*, sendo estas avaliações norteadas por regulamentações de organismos internacionais.

As organizações internacionais *Food and Agriculture Organization of the United Nations* e *World Health Organization*, estabeleceram, em 2002, nas “Diretrizes para avaliação de probióticos em alimentos” as características de resistência a acidez gástrica, resistência aos ácidos biliares, aderência a mucosa

e/ou células do epitélio intestinal de humanos, atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas, capacidade de reduzir a adesão de patógenos em superfícies epiteliais e atividade da enzima hidrolase de sais biliares, a serem avaliadas em micro-organismos de interesse probiótico.

Da mesma forma importante, a avaliação de alguns critérios de segurança para tais micro-organismos, entre eles estão à avaliação de atividade metabólica da cepa, avaliação de efeitos secundários em humanos (transferência de genes, infecção sistêmica, entre outros), atividade hemolítica e efeitos adversos incidentes em humanos.

Como as BAL de origem animal podem estar em contato direto com antibióticos e cepas patogênicas, existe a possibilidade da transferência de genes de resistência de antibióticos e de virulência para as estirpes da microbiota láctica. As culturas provenientes de matérias-primas de origem vegetal podem ser menos susceptíveis a ocorrência deste fenômeno.

A avaliação das propriedades fisiológicas, tecnológicas e probióticas dos micro-organismos isolados de vegetais são de fundamental importância para a inovação no setor dos alimentos funcionais classificados como simbióticos, aqueles adicionados de linhagens probióticas e ingredientes prebióticos, pois a principal barreira encontrada pela indústria destes alimentos é manter a viabilidade celular das cepas probióticas.

Fatores como alguns componentes da formulação e operações unitárias do processamento, as condições de umidade, temperatura e oxigênio durante a conservação e as características adversas do trato gastrointestinal, podem interferir na viabilidade das culturas.

Portanto, isolar e caracterizar linhagens de BAL das mais variadas matérias-primas vegetais, assim como aplicá-las em matrizes alimentares selecionadas com o objetivo de avaliar as propriedades probióticas e os possíveis benefícios ao hospedeiro, pode se tornar um novo foco para pesquisas nas áreas da biotecnologia agroalimentar e saúde humana e animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o *Pediococcus acidilactici* B14 quanto às propriedades probióticas e sua associação com *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 com aplicação em sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e selecionar BAL provenientes de matérias-primas de origem vegetal;
- Caracterizar quanto à aspectos de interesse tecnológico os cultivos selecionados;
- Realizar identificação molecular das estirpes de interesse;
- Caracterizar quanto ao potencial probiótico a cepa com maior índice de confirmação de sequências ribossomais;
- Desenvolver cultura associada da estirpe *Pediococcus acidilactici* B14 com a cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356;
- Avaliar as características de crescimento e de resistência ao sistema gastrointestinal da cultura associada;
- Desenvolver sobremesa com soja aerada, potencialmente simbiótica, como matriz alimentar;
- Avaliar o desempenho da cultura associada, inserida na sobremesa, quanto à resistência ao trato gastrointestinal, durante o período de armazenamento refrigerado da sobremesa;
- Avaliar as características estruturais, sanitárias, físico-químicas e sensoriais, da sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica, durante o período de armazenamento refrigerado;

3 ENCAMINHAMENTO DO TRABALHO

Esta tese está estruturada em capítulos apresentando as seguintes divisões:

- Capítulo I – Considerações iniciais acerca do trabalho, contemplando introdução, objetivo geral e objetivos específicos;
- Capítulo II – Revisão da literatura relativa aos temas abordados na pesquisa;
- Capítulos III, IV e V – Apresentação dos resultados experimentais obtidos na pesquisa, sendo organizados na seguinte sequência:
 - Cap. III – Caracterização e identificação de bactérias ácido lácticas isoladas e selecionadas de matérias-primas de origem vegetal;
 - Cap. IV – Caracterização do potencial probiótico da cepa *Pediococcus acidilactici* B14 e desenvolvimento de cultura associada com *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356;
 - Cap. V – Aplicação da cultura associada de *Pediococcus acidilactici* B14 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 para obtenção de sobremesa com soja aerada, potencialmente simbiótica.
- Capítulo VI – Considerações finais sobre o desenvolvimento do trabalho e sugestões para trabalhos futuros;

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A interação de bactérias ácido lácticas (BAL) em alimentos tem despertado, há muito tempo, o interesse de cientistas, o que resultou, em 1857, em uma contribuição significativa, por *Pasteur*, no processo de fermentação láctica. Em 1873, *Lister* isolou a primeira cultura bacteriana pura, denominada *Bacterium lactis* (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Em 1884, *Hueppe* introduziu o termo *Milchsauerbacillus* para descrever, em parte, a microbiota microbiana responsável pela acidificação de leite e produtos lácteos (INÊS *et al.*, 2008). O uso de culturas *starter* para produção de queijos e leite acidificado foi quase que simultâneo, tendo ocorrido em 1890, por *Weigman* em *Kiel* (Alemanha) e *Storch* em *Copenhague* (Dinamarca) (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Em 1919, *Orla-Jensen* definiu com razoável precisão este grupo de bactérias, usando as suas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas como critérios para estabelecer a sua diferenciação taxonômica (INÊS *et al.*, 2008).

As BAL são usualmente descritas como micro-organismos *Gram*-positivos, desprovidos de citocromos e que preferem condições anaeróbias, mas são aerotolerantes, fastidiosos, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos, produzindo ácido láctico como produto principal (STILES; HOLZAPFEL, 1997). São, também, características comuns a este grupo a não formação de esporos, catalase, oxidase e gelatinase negativos, apresentam morfologias de cocos ou bastões, não reduzem nitrato a nitrito e incapazes de utilizar o lactato (HASSAN; FRANK, 2001; CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Contudo, podem ocorrer exceções como algumas estirpes serem produtoras de pseudocatalase (AXELSSON, 1993; HOLZAPFEL; WOOD, 1995) ou serem catalase positivas e apresentarem cadeia de citocromos quando em meios contendo hematina ou compostos similares (AXELSSON, 1993; INÊS *et al.*, 2008).

Estudos de determinação de sequências de rRNA e rDNA, particularmente da subunidade 16S do rRNA, têm permitido estabelecer as relações filogenéticas que

servem de base à taxonomia atual das BAL. Por apresentarem um teor molar de G+C (guanina e citosina) inferior a 50%, as BAL típicas pertencem ao ramo *Clostridium* das bactérias *Gram*-positivas, enquanto que o ramo *Actinomycetes* cujo teor em G+C é superior a 50%, inclui espécies do gênero *Bifidobacterium* e outros gêneros também importantes da indústria de alimentos e bebidas (COENYE; VANDAMME, 2003). A FIGURA 2.1 apresenta a árvore de filogenia para grupos de BAL e gêneros *Gram*- positivos.

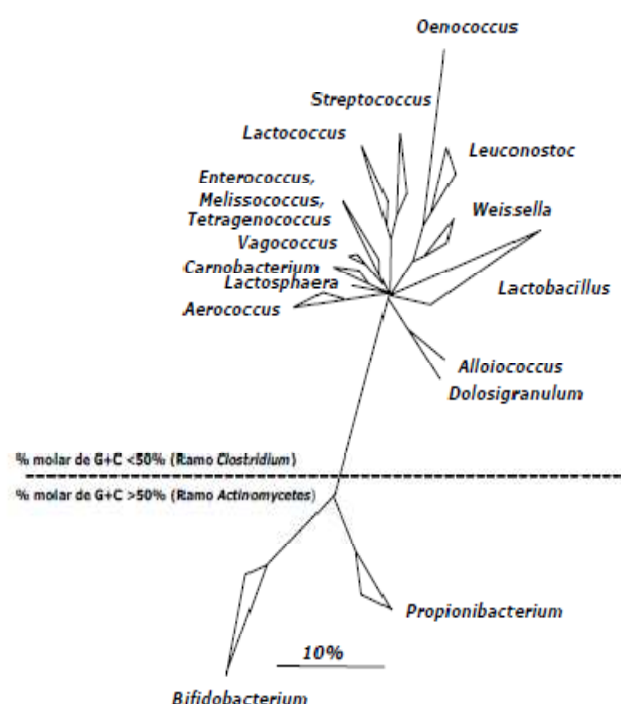


FIGURA 2.1 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS GRUPOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E GÊNEROS *GRAM*-POSITIVOS
FONTE: INÊS *et al.* (2008)

A taxonomia do grupo das BAL consiste de 12 gêneros, sendo *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (HUTKINS, 2006). Embora o gênero *Bifidobacterium* não pertença filogeneticamente ao grupo das BAL, possui determinadas propriedades fisiológicas e bioquímicas típicas destas bactérias. Portanto, por razões práticas e tradicionais, bifidobactérias são ainda consideradas uma parte do grupo das BAL (STILES; HOLZAPFEL, 1997; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

As BAL podem utilizar duas vias para metabolizar carboidratos. Na rota homofermentativa, mais de 90% da fonte de carbono é convertida exclusivamente

em ácido láctico, pela via *Embden-Meyerhof-Parnas*. Por outro lado, a via heterofermentativa resulta em quantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono (LIU, 2003).

A FIGURA 2.2 apresenta um diagrama esquemático de parte do metabolismo primário de BAL.

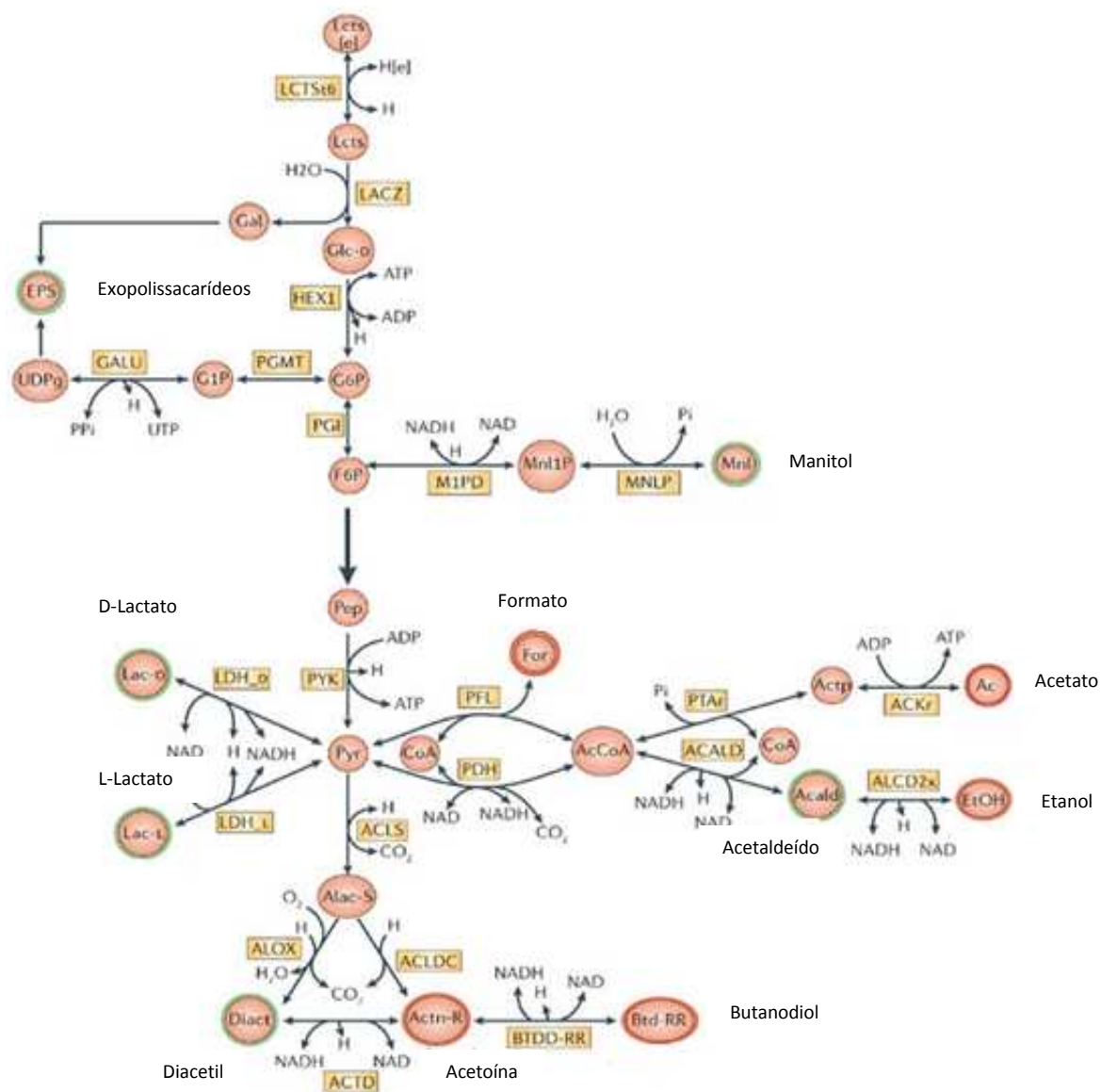


FIGURA 2.2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE PARTE DO METABOLISMO PRIMÁRIO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS
FONTE: TEUSINK e SMID (2006)

A produção de isômeros de ácido láctico (L (+) e D (-)) surge como resultado da estereoespecificidade da lactato-desidrogenase presente na célula (KANDLER, 1983; INÊS *et al.*, 2008) e varia com o gênero e a espécie da BAL (GARVIE, 1980;

BOTTAZZI, 1988; STILES; HOLZAPFEL, 1997). A forma racêmica (D/L) também pode ser formada quando estão presentes ambas as enzimas nas células, D- e L-lactato-desidrogenase, ou mais raramente, pela ação de L-lactato-racemase induzida, em combinação com uma L-lactato-desidrogenase (INÊS *et al.*, 2008).

As culturas consideradas homoláticas são dos gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus* e *Tetragenococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus*. As bactérias heteroláticas pertencem ao gênero *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Carnobacterium* e *Weissella*, assim como outras espécies de *Lactobacillus* (LIU, 2003).

As BAL são classificadas quanto a sua morfologia celular, rota metabólica utilizada para fermentar a glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido e capacidade de crescimento em altas concentrações salinas (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). O QUADRO 2.1 apresenta as principais propriedades dos gêneros de BAL.

Gênero	Morfologia celular	Rota Metabólica	Crescimento*						Isômeros do ácido láctico**
			Temperatura (°C)		NaCl (%)		pH		
			10	45	6,5	18,0	4,4	9,6	
<i>Lactobacillus (Lb.)</i>	Bacilos	Homofermentativa/Heterofermentativa	±	±	±	-	±	-	D, L, D/L
<i>Lactococcus (Lac.)</i>	Cocos	Homofermentativa	+	-	-	-	±	-	L
<i>Leuconostoc (L.)</i>	Cocos	Heterofermentativa	+	-	±	-	±	-	D
<i>Oenococcus (O.)</i>	Cocos	Heterofermentativa	+	+	±	-	±	-	D
<i>Pediococcus (P.)</i>	Cocos (tétrades)	Homofermentativa	±	±	±	-	+	-	D,L,D/L
<i>Streptococcus (St.)</i>	Cocos	Homofermentativa	-	+	-	-	-	-	L
<i>Tetragenococcus (T.)</i>	Cocos (tétrades)	Homofermentativa	+	-	+	+	-	+	L
<i>Aerococcus (A.)</i>	Cocos (tétrades)	Homofermentativa	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium (C.)</i>	Bacilos	Heterofermentativa	+	-	-	-	-	-	L
<i>Enterococcus (E.)</i>	Cocos	Homofermentativa	+	+	+	-	+	+	L
<i>Vagococcus (V.)</i>	Cocos	Homofermentativa	+	-	-	-	±	-	L
<i>Weissella (W.)</i>	Cocos	Heterofermentativa	+	-	±	-	±	-	D,L, D/L

QUADRO 2.1 – PRINCIPAIS PROPRIEDADES DOS GÊNEROS DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

FONTE: HUTKINS (2006)

NOTA: * (+) Crescimento positivo; (-) Crescimento negativo; (±) Crescimento fraco; **D-Lactato; L-Lactato;D/L-Lactato

Devido à sua capacidade limitada de biossíntese (KLAENHAMMER *et al.*, 2005), alto requerimento em fonte de carbono e nitrogênio (SALMINEN; VON WRIGHT, 1998) e sua natureza anaeróbia ou aerotolerante (CARR; CHILL; MAIDA, 2002), o *habitat* natural de BAL é representado por ambientes nutricionalmente ricos. Estando geralmente associados com matérias-primas de origem animal e vegetal, produtos fermentados e mucosas (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010) do trato gastrointestinal (TGI), respiratório e urogenital do homem e animais.

1.2 PRINCIPAIS APLICAÇÕES

As BAL são importantes na indústria de alimentos, devido à sua capacidade em transformar açúcares em ácido lático, etanol e outros metabólitos. Os referidos compostos podem alterar as características do produto pela diminuição do pH e por criar condições desfavoráveis para a multiplicação de micro-organismos potencialmente patogênicos, tanto nos alimentos quanto na microbiota intestinal humana (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Estas bactérias apresentam diferentes aplicações industriais, sendo os gêneros comumente relatados *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais e cereais), *Pediococcus* (vegetais e carne), *Oenococcus* (vinho) e *Streptococcus* (leite) (VUYST; TSAKALIDOU, 2008). Estão envolvidas em diferentes processos fermentativos, incluindo fermentação malolática de vinhos (LIU, 2003; ROJO-BEZARES *et al.* 2006), produção embutidos fermentados, queijos, iogurte, entre outros alimentos, como demonstra o QUADRO 2.2.

As BAL também têm sido empregadas na fabricação de produtos biológicos e químicos, incluindo biopolímeros (*Leuconostoc spp.*), enzimas (*Lb. brevis*), etanol e ácido lático (*Lb. casei*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. brevis*), além de compostos aromáticos e substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (INÊS, 2007).

Alimentos fermentados	Principais BAL envolvidas
Lácteos (iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, <i>buttermilk</i> , nata ácida, kefir, frozen iogurte, queijos)	<i>St. thermophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lb. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. kefiranofaciens</i> <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>L. cremoris</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>P. acidilactici</i>
Cárneos (carnes inteiras fermentadas e embutidos fermentados úmidos, semi-secos e secos)	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. sakei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. acidilactici</i>
Vegetais (chucrute, pickles, azeitonas, kimchi, soja)	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. bavaricus</i> <i>Lb. casei</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>Lb. brevis</i> <i>W. kimchii</i> <i>L. lactis</i> <i>L. citreum</i> <i>L. inhae</i> <i>L. gelidum</i> <i>L. kimchii</i> <i>L. fallax</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>P. soyae</i>
Panificados (pães e biscoitos)	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. sanfranciscensis</i> <i>P. acidilactici</i>
Bebidas (vinhos)	<i>O. oeni</i> <i>Lb. delbrueckii</i>

QUADRO 2.2 – ALIMENTOS FERMENTADOS E PRINCIPAIS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ENVOLVIDAS

FONTE: Adaptado de HUTKINS (2006) e INÊS (2007).

1.3 GÊNERO *Pediococcus*

A formação em tétrade e o formato esférico servem como características chaves para o reconhecimento inicial do gênero *Pediococcus* (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Apresentam, também, outras características, como um complexo requerimento nutricional. Sendo assim, requerem a presença de ácido nicotínico, ácido pantotênico e biotina (RAY; HOOVER, 1993), condições anaeróbias ou facultativas, e temperaturas entre 25 a 40°C, podendo algumas espécies crescer em até 50°C, condições de acidez de pH 4,5 a 8,2 e em concentrações salinas de 6,5% (HUTKINS, 2006).

Atualmente, pertencem ao gênero *Pediococcus*, 12 espécies, como o *P. acidilactici* (TANASUPAWAT *et al.*, 1993), *P. claussenii* (DOBSON *et al.*, 2002), *P. cellicola* (ZHANG; TONG; DONG, 2005), *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvullus*, *P. pentosaceus*, *P. stilesii* (FRANZ *et al.*, 2006), *P. ethanolidurans* (LIU *et al.*, 2006), *P. siamensis* (TANASUPAWAT *et al.*, 2007), *P. argentinus* (DE BRUYNE *et al.*, 2008) e *P. lolii* (DOI *et al.*, 2009). O QUADRO 2.3 apresenta as cepas de *Pediococcus* e os alimentos dos quais foram isolados.

Cepas	Codificação GenBank*	Fontes/Habitats
<i>P. damnosus</i>	AJ318414/D8767	Cervejaria, vinhos e sidra
<i>P. acidilactici</i>	AJ305320/M58833	Materiais vegetais, leite e produtos lácteos
<i>P. parvulus</i>	D88528	Chucrute, silagem, vinho
<i>P. inopinatus</i>	AJ271383	Chucrute e cerveja
<i>P. pentosaceus</i>	AJ305321/M58834	Materiais vegetais, embutidos fermentados, leite e derivados
<i>P. cellicola</i>	AY956788	Adega de bebidas fermentadas e destiladas
<i>P. claussenii</i>	AJ621555	Cerveja e cerveja deteriorada
<i>P. stilesii</i>	AJ973157	Grãos de milho branco
<i>P. ethanolidurans</i>	AY956789	Adega de bebidas fermentadas e destiladas
<i>P. siamensis</i>	AB258357	Folhas de chá fermentado (<i>Miang</i>)
<i>P. argentinus</i>	AM 709786	Farinha de trigo comercial
<i>P. lolii</i>	AB362985	Silagem de azevém

QUADRO 2.3 – CEPAS DE *Pediococcus* E SEUS HABITATS

FONTE: O autor (2012)

NOTA:*Base de dados: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Lista de nomes procarióticos com nomenclatura reconhecida (LPSN- [http:// www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)) e The Taxonomic Outline of Bacteria and Archea – Índice taxonômico dos procariotas (TOBA – <http://www.taxonomicoutline.org>)

De acordo com Stiles e Holzapfel (1997), anteriormente as cepas isoladas de cerveja e vegetais eram denominadas de *P. cerevisae*, sendo posteriormente renomeadas de *P. damnosus* e *P. pentosaceus*, respectivamente. Para as espécies

utilizadas como cultura *starter* em embutidos, também definidas como *P. cerevisae*, foi dada a nomenclatura de *P. acidilactici*. As estirpes de *P. urinaeequi* e *P. halophilus* foram reclassificadas como *Aerococcus urinaeequi* e *Tetragenococcus halophilus* (DOI *et al.*, 2009) e *P. dextrinicus* como *Lb. dextrinicus* (HAAKENSEN *et al.*, 2009).

Os pediococos são homofermentativos e produzem ácido láctico exclusivamente a partir da fermentação da glicose, utilizando a via glicolítica (STILES; HOLZAPFEL, 1997). O piruvato pode ser desviado para formação de outros produtos finais como diacetil e acetoína, que são muitas vezes produzidos por *P. damnosus*, enquanto *P. pentosaceus* produz quantidades equimolares de lactato e acetato a partir de pentoses (COELHO, 2011). Para Ray e Hoover (1993) *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* crescem igualmente tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, sendo que a diferença fenotípica entre as duas espécies está no crescimento a 50°C pelo *P. acidilactici*.

Os pediococos são encontrados em ambientes ricos em açúcares fermentescíveis, em alimentos fermentados como picles e carnes conservadas e materiais vegetais (ZHANG; TONG; DONG, 2005) como silagem (DANIELSEN *et al.*, 2007). Apesar da incapacidade de fermentar a lactose (HUTKINS, 2006) os pediococos têm sido isolados tanto de queijos comerciais como *Cheddar* quanto de queijos artesanais, participam do chamado grupo de BAL não-*starter* que contribuem para a maturação de queijos (GURIRA; BUYS, 2005). Alguns micro-organismos do gênero *Pediococcus* são deterioradores em alimentos fermentados, em particular bebidas como cerveja, vinhos e sidra (HUTKINS, 2006).

São empregados como culturas *starter* na fermentação de vegetais como na produção de chucrute (HUTKINS, 2006), azeitonas de mesa (PERES *et al.*, 2012) e produtos típicos como *gundruk*, *sinki*, *khalti* e *inziangsang* de regiões do Himalaia (TAMANG *et al.*, 2005), *tempoyak* da Indonésia e Malásia (YULIANA; GARCIA, 2009). Na fabricação de embutidos cárneos fermentados são exemplo o *alheira*, típico de Portugal (ALBANO *et al.*, 2007) e *salsiccia* e *soppressata* da Itália (BONOMO *et al.*, 2008), *sobrasada*, *fuet*, *salchichón* e *chorizo* da Espanha (HUTKINS, 2006).

Algumas cepas de *Pediococcus spp.* produzem peptídeos antimicrobianos que inibem outras BAL, patogênicas e deterioradoras Gram-positivas

(KLAENHAMMER, 1993; ENNAHAR *et al.*, 2000; GURIRA e BUYS, 2005), sendo um traço particularmente importante deste gênero (HUTKINS, 2006). As bacteriocinas produzidas por *Pediococcus* spp. são classificadas como classe IIa e apresentam alta atividade antimicrobiana, especialmente frente a *Listeria monocytogenes* (RODRIGUEZ *et al.*, 2005; ALTUNTAS; COSANSU; AYHAN, 2010). Sendo a pediocina AcH (PA-1), produzida por *P. acidilactici*, a primeira completamente caracterizada como classe IIa (ALBANO *et al.*, 2007). Outras bacteriocinas foram isoladas a partir de distintas cepas de *P. acidilactici*, por exemplo, pediocina JD por *P. acidilactici* SJ-1 (SCHVED *et al.*, 1993), pediocina 5 por *P. acidilactici* UL5 (HUANG *et al.*, 1996) e pediocina AS-1 por *P. acidilactici* NRRL B5627 (ANASTASIADOU *et al.*, 2008).

Os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* fazem parte da microbiota intestinal de humanos e animais, sendo do gênero *Pediococcus* as cepas comumente isoladas da microbiota intestinal humana são *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009).

1.4 GÊNERO *Lactobacillus*

As bactérias do gênero *Lactobacillus* se apresentam na forma de bacilos ou cocobacilos, isolados ou em cadeias, são anaeróbios facultativos e ácido-tolerantes, com pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2 (PRADO, 2007), sendo que as espécies contêm de 32 a 53% de G+C no conteúdo do DNA cromossomal (BURITI; SAAD, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Apesar da diversidade metabólica, os lactobacilos geralmente são fastidiosos e muitas espécies requerem ambientes ricos em nutrientes. Eles não são especialmente proteolíticos ou lipolíticos, e normalmente requerem aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos para seu crescimento rápido (HUTKINS, 2006). São nutricionalmente exigentes, requerendo nutrição complexa: aminoácidos e fatores de crescimento como pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina (OLIVEIRA, 2010).

Os lactobacilos podem ser encontrados em diversos *habitats* como alimentos, animais e humanos. Em humanos, estas bactérias colonizam a cavidade bucal, o TGI e geniturinário (PAROLO, 2009).

Originalmente, a taxonomia do gênero *Lactobacillus* foi baseada em propriedades fenotípicas, sendo dividido por *Orla-Jensen*, em 1919, em três subgêneros *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium* de acordo com sua temperatura de crescimento e a via metabólica de fermentação das hexoses (KLEIN *et al.*, 1998).

Os lactobacilos podem ser divididos em três grupos baseados no produto final de sua fermentação:

- Grupo 1: obrigatoriamente homofermentativos, incluem aqueles que fermentam a glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato. Exemplos: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, etc.
- Grupo 2: facultativamente heterofermentativos, incluem espécies que fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás carbônico a partir de gliconato, mas não pela glicose. Também fermentam pentoses por meio de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético. Exemplos: *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, etc.
- Grupo 3: obrigatoriamente heterofermentativos, lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás carbônico a partir da glicose é a característica marcante dessas bactérias. Exemplos: *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. reuteri*, etc. (AXELSSON, 2004; BURITI; SAAD, 2007).

Este grupo se apresenta bastante heterogêneo, com o número de espécies sendo continuamente modificado devido à descrição de novas espécies e/ou reclassificação de outras (CAUFIELD *et al.*, 2007). De acordo com Parolo (2009), em 2009 haviam sido identificadas e/ou reclassificadas 155 espécies de lactobacilos. Em 2012 este número é de 182 espécies e 27 subespécies conforme a *Lista de nomes procarióticos com nomenclatura reconhecida*, disponível em <<http://www.bacterio.cict.br>>.

Dentre as BAL o subgrupo *Lb. acidophilus*, do complexo dos lactobacilos, apresenta particular interesse devido ao fato da maioria de seus membros ocuparem importantes ambientes, como o TGI de humanos e animais. A cepa *Lb. acidophilus* é provavelmente a espécie mais estudada deste gênero (KLAENHAMMER *et al.*, 2008; JAFEREI; EBRAHIMI, 2011). Descrito como um bacilo circular aparecendo em

pares ou formando pequenas cadeias, *Gram*-positivo, imóvel e não esporulante, pertence ao grupo dos homofermentativos obrigatórios com propriedades acidificantes (2,7% de ácido láctico) e termofílicas (40-52°C) (DU PLESSIS *et al.*, 1996; SOUZA OLIVEIRA, 2009).

Encontrado naturalmente na microbiota intestinal e no trato urogenital humano, o *Lb. acidophilus* é amplamente empregado em produtos lácteos fermentados, sendo considerado de interesse industrial e medicinal (DERAZ *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2010), pois apresenta como principais funções a proteção contra patógenos, auxílio na digestão da lactose, elevação no padrão nutricional dos alimentos, estimulação da resposta imune intestinal e regulação dos níveis de colesterol no organismo (MALGANHA, 2010).

2 PROBIÓTICOS

2.1 GENERALIDADES SOBRE A MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

O termo microflora ou microbiota intestinal refere-se à população de bactérias que reside normalmente no TGI humano, que começa a se formar ainda no canal do parto e adquire suas características principais em torno dos dois anos de idade (TRABULSI, 2000). A partir daí a composição da microbiota permanece relativamente constante (QUIGLEY; QUERA, 2006; BURITI, 2008).

O intestino humano é o *habitat* de uma comunidade bacteriana ampla e dinâmica, mas uma parte substancial desta população ainda não está caracterizada ou é incultivável (TURRONI *et al.*, 2008; ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2011). Porém, a microbiota gastrointestinal humana forma um complexo ecossistema de, aproximadamente, 800 a 1000 espécies bacterianas (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; SMIDT; DE VOS, 2007; O'TOOLE; COONEY, 2008).

No estômago humano, previamente considerado estéril, exceto no caso de infecções com *Helicobacter pylori*, foi revelado, por sequenciamento do gene 16S rRNA ser colonizado por bactérias (BIK *et al.*, 2006). As bactérias da microbiota intestinal são encontradas no intestino delgado e grosso, sendo este o mais densamente colonizado, conforme apresenta a FIGURA 2.3.

No intestino delgado proximal estão presentes micro-organismos do gênero estafilococos, estreptococos e lactobacilos, sendo raramente encontradas bactérias anaeróbias. No íleo distal a microbiota torna-se diversificada, uma vez que passa a abranger coliformes, e várias espécies de bactérias anaeróbias, como bacteróides, fusobactérias e clostrídeos. No intestino grosso as bactérias anaeróbias superam as demais (facultativas e aeróbias), predominando os bacteróides, bifidobactérias e fusobactérias. Os lactobacilos, estreptococos, clostrídeos e enterobactérias são também frequentes (TRABULSI, 2000).

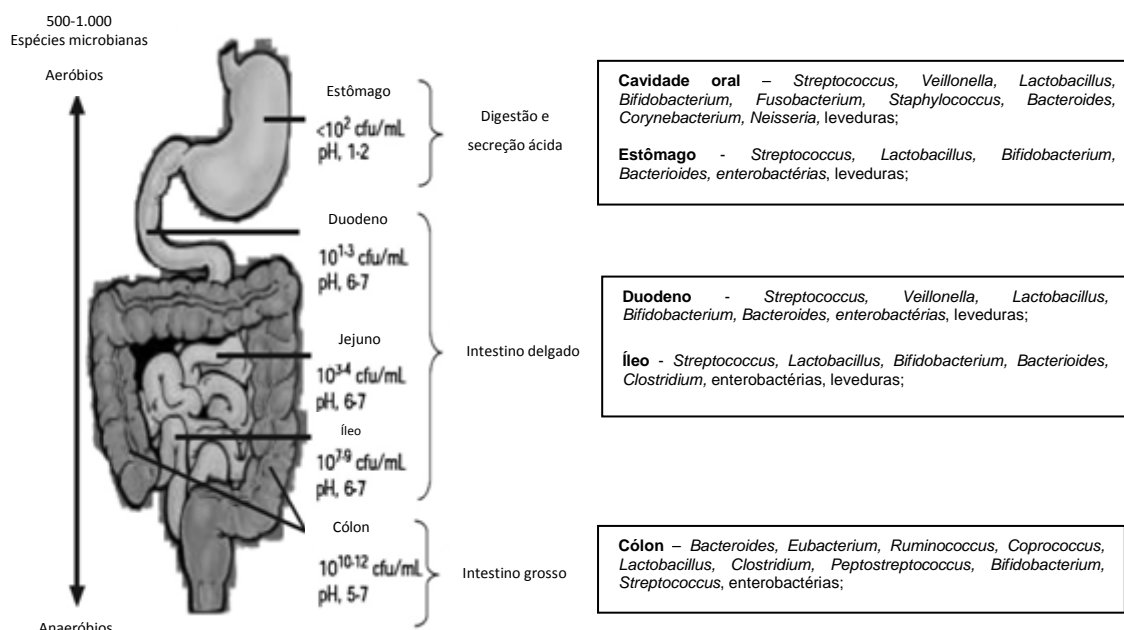


FIGURA 2.3 - DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO SISTEMA DIGESTÓRIO

FONTE: Adaptado de IANNITTI e PALMIERI (2010) e TRABULSI (2000)

A microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem estar e a proteção contra alterações de ordem patológica, especialmente do TGI (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; BURITI, 2008). Desempenha um papel fundamental na saúde global do hospedeiro pela sua atividade metabólica e regulação fisiológica, como a promoção da absorção de nutrientes, síntese de compostos bioativos, melhora na função de barreira intestinal, motilidade, resistência à patógenos e modulação do sistema imune (GRIMOUD *et al.*, 2010).

Quando em equilíbrio, a microbiota intestinal impede que micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos. Por outro lado, quando ocorre o desequilíbrio pode resultar na proliferação de patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER; GIBSON, 1998; ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; BADARÓ *et al.*, 2008). Este comportamento da microbiota foi definido por Roberfroid, Gibson e Hoyles (2010) pelos termos normobiose, que caracteriza um ecossistema intestinal no qual a composição de micro-organismos benéficos predomina em relação aos potencialmente prejudiciais, e disbiose em que o número de micro-organismos potencialmente patogênicos é dominante, criando uma situação de pré-disposição a doenças.

2.2 DEFINIÇÃO E ORIGEM DOS PROBIÓTICOS

Classicamente, os probióticos foram definidos como suplementos à base de micro-organismos vivos que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro, promovendo a manutenção ou melhoria do equilíbrio de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Contudo, a definição aceita foi proposta pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) (2001), como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010).

Os micro-organismos probióticos são principalmente de origem humana ou animal; entretanto, alguns estudos têm demonstrado que algumas cepas reconhecidas como probióticas são também encontradas em substratos fermentados não-lácteos (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Uma ampla variedade de espécies e gêneros é considerada potencialmente probiótica (HOLZAPFEL *et al.*, 1998; VASILJEVIC; SHAH, 2008) e comercialmente, as cepas mais importantes são BAL (VASILJEVIC; SHAH, 2008). As espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* representam os micro-organismos comumente pesquisados, por conferir benefícios à saúde conforme o QUADRO 2.4.

Bactérias Ácido Lácticas			Outras cepas
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i> (B.)	Outros gêneros	
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>Lb. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lac. lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>P. acidilactici</i>	
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>St. thermophilis</i>	
<i>Lb. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>St. diacetylactis</i>	
<i>Lb. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>St. intermedius</i>	
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>Lb. johnsonii</i>			
<i>Lb. paracasei</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. reuteri</i>			
<i>Lb. rhamnosus</i>			

QUADRO 2.4 - PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS
FONTE: Adaptado de SAAD *et al.* (2013)

Outras bactérias lácticas como *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., bem como a cepa de *Escherichia coli* Nissle 1917, alguns bacilos e outros micro-organismos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* têm sido estudados por seu uso como probióticos (SANDERS *et al.*; RAUCH; LYNCH, 2011). O gênero *Enterococcus* não é considerado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) e as avaliações quanto à segurança destes micro-organismos permanecem controversas (OGIER; SERRA, 2008; PERES *et al.*, 2012). Em alguns países o uso de *Enterococcus* sp. como probiótico tem sido questionado, devido aos aspectos de segurança, no que diz respeito a transferência de genes que conferem resistência alguns antibióticos (LUND; EDLUND, 2001; LJUNGH; WADSTRÖM, 2006).

2.3 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS PROBIÓTICOS

As características essenciais para uma cepa ser considerada probiótica são: ser reconhecida como segura ou GRAS, apresentar viabilidade durante processamento e armazenamento, ter efeito antagonista frente a patógenos, ser tolerante à presença e variações de acidez e a sais biliares, possuir capacidade de aderência ao epitélio intestinal do hospedeiro (PAN *et al.*, 2009), assim como apresentar resistência frente às condições do sistema gastrointestinal (amilases da cavidade oral, baixo pH do estômago, secreções biliares e suco pancreático excretados na região duodenal) para poder colonizar temporariamente o intestino (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2012).

Nas diretrizes, estabelecidas para avaliação de probióticos em alimentos a FAO e WHO (2002) propõem critérios para uma cepa ser considerada probiótica, como apresentado no QUADRO 2.5.

Critérios gerais	Propriedades
Segurança	Origem
	Patogenicidade (atividade hemolítica) e infectividade
	Fatores de virulência: toxicidade, atividade metabólica e propriedades intrínsecas (ex.: resistência a antibióticos)
	Avaliação de efeitos secundários em humano (ex.: infecção sistêmica, transferência de genes, atividade metabólica deletéria)
Tecnológicos	Cepas geneticamente estáveis
	Viabilidade desejada durante processamento e armazenamento
	Boas propriedades sensoriais
	Resistência a fagos
	Produção em larga escala
Funcionais	Tolerância à acidez gástrica e sucos (gástrico e entérico)
	Tolerância à bile
	Atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas
	Adesão à superfície da mucosa
	Redução da adesão de patógenos na superfície da mucosa (competição)
	Efeitos benéficos validados e documentados
Desejáveis (fisiológicos)	Imunomodulação
	Atividade antagonista frente a patógenos gastrointestinais (ex.: <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Candida albicans</i>)
	Metabolismo de colesterol (atividade de hidrolase de sais biliares)
	Metabolismo da lactose
	Propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas

QUADRO 2.5 - CRITÉRIOS FUNDAMENTAIS E DESEJÁVEIS PARA SELEÇÃO DE PROBIÓTICOS EM APLICAÇÕES COMERCIAIS

FONTE: Adaptado de FAO/WHO (2002) e VASILJEVIC e SHAH (2008)

2.4 EFEITOS BENÉFICOS E MECANISMOS PROPOSTOS

Propiciar o equilíbrio da microbiota intestinal talvez seja o principal efeito dos probióticos, mas há vários outros benefícios à saúde que estão associados ao uso destes micro-organismos (PRADO, 2007). Entre eles, destaca-se a melhora do sistema imune, a redução de intolerância à lactose, a redução no nível do colesterol sérico e pressão sanguínea, a atividade anti-carcinogênica (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010), a capacidade ativa de digestão, atividade antagonista frente a patógenos e manutenção na integridade do cólon intestinal (RODRIGUES *et al.*, 2011).

O primeiro interesse clínico relatado na literatura para uso dos probióticos foi o tratamento de doenças infecciosas incluindo diarreias virais ou bacterianas, e doenças inflamatórias crônicas tais como colite ulcerativa e pouchite (SAAD *et al.*, 2013). O QUADRO 2.6, sumariza os principais efeitos benéficos dos probióticos, assim como os mecanismos propostos.

Efeitos benéficos	Mecanismos
Alívio da intolerância alimentar	Disponibiliza β -galactosidase intracelular no TGI humano (intolerância lactose)
Prevenção e redução dos sintomas de diarreia associada com rotavírus e antibiótico	Exclusão competitiva
	Translocação/Efeito barreira
	Melhora da resposta imune
Tratamento e prevenção de alergias (alimentar e eczema atópico)	Exclusão imune, eliminação e regulação Supressão da hipersensibilidade
Redução dos riscos associado com mutagenicidade e carcinogenicidade	Metabolismo de mutagênicos
	Alteração da microecologia intestinal
	Alteração da atividade metabólica intestinal
	Normalização da permeabilidade intestinal
	Imunidade intestinal reforçada
Redução do risco de doença cardiovascular (efeito hipocolesterolêmico)	Desconjugação de sais biliares
Inibição de <i>Helicobacter pylori</i> e patógenos intestinais	Exclusão competitiva
	Efeito barreira
	Produção de compostos antimicrobianos
Prevenção de doenças inflamatórias no intestino	Exclusão competitiva
	Modificação da permeabilidade intestinal
	Modulação da resposta imune
	Produção de compostos antimicrobianos
	Decomposição de antígenos patogênicos
Estimulação do sistema imune	Indução do sistema inato e adaptativo
Redução da população de patógenos	Exclusão competitiva
	Antagonismo direto

QUADRO 2.6 – ALGUNS EFEITOS BENÉFICOS, ESTABELECIDOS E POTENCIAIS ATRIBUÍDOS AOS ORGANISMOS PROBIÓTICOS

FONTE: Adaptado de VASILJEVIC e SHAH (2008) e O'TOOLE e COONEY (2008)

O mecanismo e a eficácia dos efeitos de um probiótico geralmente dependem da interação com a microbiota específica do hospedeiro ou com as células imuno-competentes da mucosa intestinal (GUARNER; MALAGELADA, 2003; SAAD *et al.*, 2013). Três possíveis mecanismos de ação têm sido atribuídos aos probióticos: supressão do número de células viáveis, através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão; alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou da diminuição da atividade enzimática; estímulo da imunidade do hospedeiro, pelo aumento dos níveis de anticorpos e da elevação da atividade dos macrófagos (FULLER, 1989; SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011). A FIGURA 2.4 ilustra um diagrama esquemático com os mecanismos potenciais e conhecidos dos probióticos.

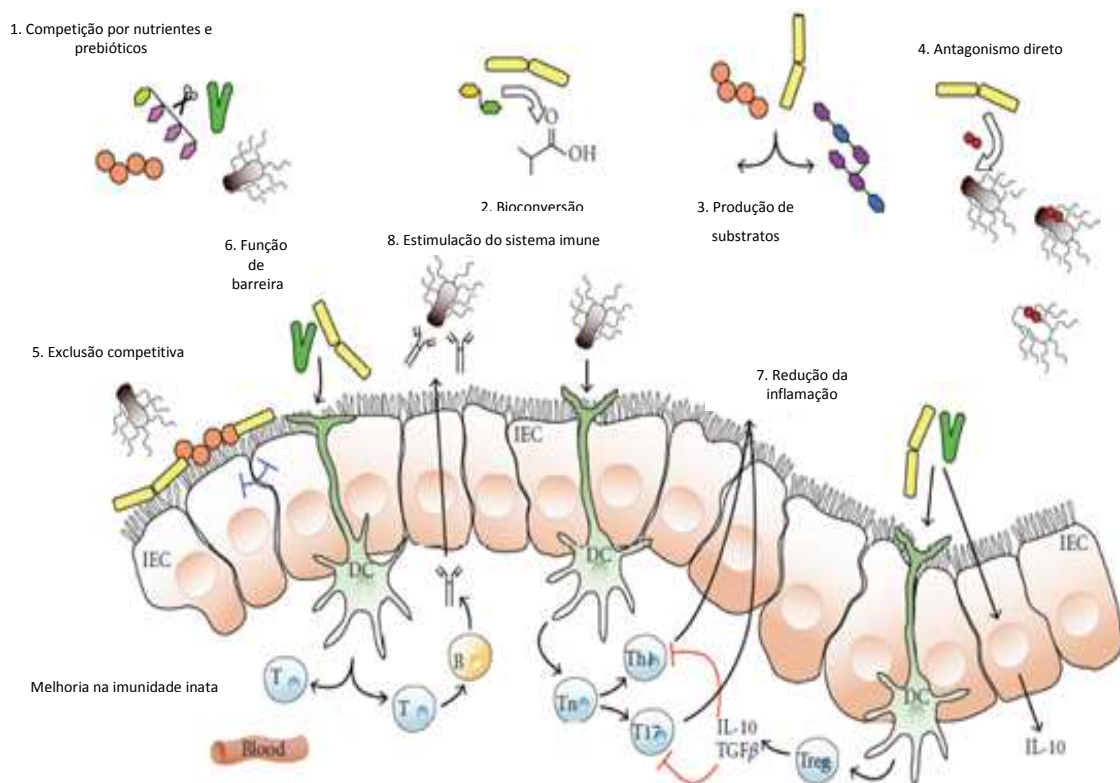


FIGURA 2.4 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS MECANISMOS POTENCIAIS DOS PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA.

FONTE: Adaptado de O'TOOLE e COONEY (2008).

NOTA: Estes mecanismos incluem: (1) Competição por nutrientes e prebióticos como substratos de crescimento; (2) Bioconversão de compostos (Ex. açúcares); (3) Produção de substratos de crescimento para outras bactérias (Ex. vitaminas); (4) Antagonismo direto por bacteriocinas; (5) Exclusão competitiva por sítios de ligação; (6) Melhora na função barreira; (7) Redução da inflamação; (8) Estimulação da resposta imune inata. IEC – Células epiteliais (*epithelial cells*); DC – Células dendríticas (*dendritic cells*); T – células T; B – células B; Th1 – células T-helper 1; Th17 – células T-helper 17; TGFβ – fator de transformação do crescimento (*transforming growth factor beta*); Treg – células T regulatórias (*regulatory T cells*); IL-10 – interleucina 10 (*interleukin 10*).

A modulação da microbiota intestinal, por parte dos micro-organismos probióticos, ocorre através de um mecanismo denominado de exclusão competitiva. Esse mecanismo impede a colonização da mucosa intestinal por micro-organismos potencialmente patogênicos, pela competição por sítios de adesão, por nutrientes e/ou da produção de compostos antimicrobianos (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; GUARNER; MALAGELADA, 2003; SAAD, 2006).

Para O'Toole e Cooney (2008) algumas das formas em que os probióticos podem impactar sobre a composição da microbiota é, aparentemente, pela competição do substrato disponível, e pela alteração da dinâmica de utilização dos carboidratos pelos componentes individuais da microbiota. As bactérias probióticas também podem antagonizar bactérias patogênicas pela redução do pH luminal, inibindo a

aderência bacteriana e translocação, ou produzindo substâncias antibacterianas, denominadas de bacteriocinas e defensinas, peptídeos antimicrobianos envolvidos nos mecanismos de defesa inatos. Um dos mecanismos pelos quais a flora intestinal resiste à colonização por bactérias patogênicas é pela produção de um ambiente fisiologicamente restritivo, em relação ao pH, potencial redox e produção de sulfeto de hidrogênio (NG *et al.*, 2009).

Embora a ligação bacteriana nas células do epitélio intestinal nunca tenha sido observada *in vivo*, os probióticos podem competir com bactérias patogênicas por sítios de ligação e, isto, previne a colonização do intestino por espécies bacterianas como *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e certas cepas de *Escherichia coli* (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; LIN *et al.*, 2008). A exclusão competitiva, baseada na ligação dos mesmos sítios receptores glicoconjugados na superfície epitelial, por probióticos e bactérias patogênicas, parece ser um dos mecanismos fundamentais que explicam tais constatações (WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010).

A adesão a superfícies mucosas por micro-organismos probióticos é uma importante habilidade para a colonização do TGI humano, que impede sua eliminação por peristaltismo e proporciona vantagem competitiva sobre patógenos (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). A auto-agregação parece ser necessária para a adesão de cepas probióticas em células do epitélio intestinal e a habilidade de co-agregação pode formar barreira que previne a colonização por patógenos (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008).

A função de barreira da mucosa intestinal é um importante mecanismo de defesa, para a manutenção da integridade do epitélio e proteção do organismo em relação ao ambiente. Uma vez esta barreira rompida, antígenos de bactérias e alimentos podem atingir a submucosa e induzir uma resposta inflamatória, que pode resultar em desordens intestinais como doenças inflamatórias (HOOPER *et al.*, 2003; SARTOR, 2006; WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010). Portanto, a melhoria desta função da mucosa pode ser um importante mecanismo pelo qual bactérias probióticas podem beneficiar a saúde do hospedeiro (MEDDINGS, 2008; NG *et al.*, 2009), pois impacta de forma direta na eficiência da invasão de patógenos, na

severidade dos danos no tecido epitelial e no índice de liberação de nutrientes derivados do hospedeiro (O'TOOLE; COONEY, 2008).

As BAL são caracterizadas pela liberação de diversas enzimas no lúmen intestinal, exercendo efeito sinérgico sobre a digestão e aliviando sintomas de deficiência na absorção de nutrientes. A hidrólise enzimática bacteriana pode aumentar a biodisponibilidade de proteínas e de gordura e aumentar a liberação de aminoácidos livres. Além de ácido láctico, os ácidos graxos de cadeia curta, como propiônico e butírico, também são produzidos pelas BAL. Quando absorvidos, esses ácidos graxos contribuem para o *pool* de energia disponível do hospedeiro e, podem proteger contra mudanças patológicas na mucosa do cólon (KOOP-HOOLIHAN, 2001; SAAD; BEDANI, MAMIZUKA, 2011).

Grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugerem que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune inespecífica quanto específica. Acredita-se que estes efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocina, e da atividade das células destruidoras naturais (NK- *natural killer*) e/ou dos níveis de imunoglobulinas. Importante salientar que os efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (KOOP-HOOLIHAN, 2001; CALDER; KEW, 2002; VAN DE WATER, 2003; SAAD; BEDANI, MAMIZUKA, 2011).

Os probióticos podem regular a resposta imune, a partir de uma complexa interação com o sistema imunológico do hospedeiro, além de diferentes componentes bacterianos, incluindo o DNA cromossômico, componentes da parede celular e metabólitos solúveis. Estes metabólitos podem alterar a permeabilidade epitelial, inibir a cascata inflamatória ou mediar à ativação/maturação/sobrevivência de células dendríticas (MADSEN *et al.*, 2001; MENAR *et al.*, 2004; HOUARAU *et al.*, 2006; SAAD; BEDANI, MAMIZUKA, 2011).

3 ASSOCIAÇÃO DE CULTURAS LÁTICAS

As BAL quando associadas podem sofrer diversos tipos de interações, como estimulação (protocooperação), inibição (antagonismo) e ausência de efeitos (VINDEROLA; MOCCHUITTI; REINHEIMEIR, 2002).

O exemplo clássico de interação microbiana é a simbiose entre as culturas *starter*, empregadas na fabricação de iogurte. O *Lb. bulgaricus* e *S. thermophilus*. De acordo com Spreer e Mixa (1998) o *Lb. bulgaricus* produz enzimas que degradam a caseína, liberando peptídeos e aminoácidos como treonina, metionina e valina, moléculas utilizadas como fatores de crescimento para o *S. thermophilus*. Em contrapartida, *S. thermophilus* produz ácido láctico, dióxido de carbono e ácido fórmico a partir da degradação da lactose, crescendo rapidamente até o valor de pH 5,5. A liberação do ácido fórmico e do dióxido de carbono estimula o desenvolvimento do *Lb. bulgaricus*, que produz compostos que contribuem para o desenvolvimento do sabor característico do iogurte.

Quando as interações microbianas são desfavoráveis, podem ocorrer mudanças indesejáveis na composição da flora bacteriana durante a produção e a estocagem refrigerada do produto (BELLENGIER; RICHARD; FOCAUD, 1997; SACCARO, 2008). Portanto, a seleção da melhor combinação de estirpes deve ser uma medida adotada para aperfeiçoar o desempenho tecnológico e favorecer a sobrevivência bacteriana durante a estocagem (SACCARO, 2008).

Em produtos lácteos fermentados probióticos, as bactérias com propriedades probióticas apresentam crescimento lento, devido a sua baixa atividade proteolítica, sendo prática comum a adição das culturas *Lb. bulgaricus* e *S. thermophilus* para reduzir o tempo de fermentação. Entretanto, para minimizar problemas com a perda de viabilidade da cepa probiótica devido à pós-acidificação, *Lb. bulgaricus* tem sido substituído por *Lb. acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium* (DAVE; SHAH, 1998).

Os principais objetivos de associar BAL são para minimizar deficiências metabólicas como a baixa atividade proteolítica, a restrição quanto à fermentação de alguns açúcares inerentes as determinadas espécies, e potencializar as características favoráveis como a atividade acidificante, formação de compostos aromáticos (diacetil e acetoína) produção de exopolissacarídeos, atividade de

degradação de proteínas para liberação de peptídeos bioativos e aminoácidos essenciais e, produção de substâncias antimicrobianas.

Na indústria de alimentos as culturas associadas podem ser utilizadas no processamento de produtos lácteos e cárneos. Para insumos veterinários as culturas associadas são utilizadas em suplementos alimentares. O QUADRO 2.7 apresenta alguns exemplos de produtos que contém culturas associadas.

Produtos	Composição microbiana	Origem
Produtos cárneos		
Embutidos (cultura <i>starter</i>)	<i>Lb. sakei</i> , <i>S. carnosus</i> e <i>S. xylosus</i>	Texel/Danisco
Embutidos (cultura <i>starter</i>)	<i>P. acidilactici</i> e <i>P. pentosaceus</i>	Bactoferm LHP/Christian Hansen
Embutidos (cultura <i>starter</i>)	<i>P. pentosaceus</i> e <i>S. xylosus</i>	BactofermT-SPX/Christian Hansen
Embutidos (cultura <i>starter</i>)	<i>Lb. sakei</i> e <i>S. carnosus</i>	Bactoferm F-RM-52/Christian Hansen
Embutidos (cultura <i>starter</i>)	<i>P. acidilactici</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>Lb. sakei</i> e <i>P. pentosaceus</i>	Safe Pro B-LC007/Christian Hansen
Produtos lácteos		
Derivados lácteos (cultura probiótica)	<i>B. lactis</i> Bi-07 e <i>Lb. acidophilus</i> NCFM	Howard Protect/Danisco
Leite fermentado (cultura <i>starter</i> /probiótica)	<i>St. thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	ABT-4/Christian Hansen
logurte e Queijos frescos (culturas <i>starter</i>)	<i>Lb. rhamnosus</i> e <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Holdbac YM-B LYO/Danisco
logurte (cultura <i>starter</i> / probiótica)	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	ABY-10/Christian Hansen
logurte (cultura <i>starter</i>)	<i>Lb. bulgaricus</i> e <i>St. thermophilus</i>	YC-180/ Christian Hansen
Suplemento alimentar (humano)		
Suplemento probiótico	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lac. lactis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>P. acidilactici</i> e <i>Lb. bulgaricus</i>	Power Dophilus/Power Health
Suplemento alimentar (animal)		
Suplemento probiótico e promotor de crescimento (pequenos animais e suínos)	<i>P. acidilactici</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>boulardii</i>	Mito Max, Mito Max Super e Mito Super e Mito Swine/ Imagilin
Suplemento probiótico	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. buchneri</i> e <i>E. faecium</i>	Lactosilo/SLO
Suplemento probiótico e promotor de crescimento (larvicultura marinha)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>E. faecium</i> e <i>P. acidilactici</i>	Aqualac-Bacto/Ambio
Suplemento probiótico e promotor de crescimento para suínos	<i>B. subtilis</i> , <i>P. acidilactici</i> e <i>Paracoccus denitrificans</i>	Top Enro/Bio One

QUADRO 2.7 – EXEMPLOS DE PRODUTOS QUE CONTÉM CULTURAS ASSOCIADAS
FONTE: O autor (2012)

4 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão no início da década de 90, que trata de alimentos que, devido aos seus componentes fisiologicamente ativos, podem beneficiar a saúde das pessoas e fornecer nutrição básica (ILSI, 1999; STRINGHETA; OLIVEIRA; GOMES, 2007). Não existe uma definição internacionalmente aceita sobre alimentos funcionais (SILVEIRA; VIANNA; MOSEGUI, 2009), embora o proposto pelo *European Consensus on Scientific Concepts of Functional Foods* que “um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado o seu efeito em uma ou mais funções alvo do organismo, além de apresentar características nutricionais adequadas, de modo que seja relevante para melhoria da saúde e do bem estar e/ou redução dos riscos de doenças” (HENSON; MASAKURE; CRANFIELD, 2008). Este conceito tem obtido ampla aceitação por parte dos consumidores, os quais manifestam um grande interesse sobre as questões de saúde que incluem a alimentação (JONES; JEW, 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não define alimentos funcionais, porém a legislação referente aborda o tema como alegação de propriedade funcional utilizando vários documentos como a Resolução nº18 de 30 de abril de 1999 que dispõem sobre as “Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos” (BRASIL, 1999a) e a Resolução nº19 de 30 de abril de 1999 que trata do “Regulamento técnico de procedimento para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem” (BRASIL, 1999b).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº2 de 7 de janeiro de 2002 se refere ao “Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde” (BRASIL, 2002) e a lista de alegações de propriedade funcional aprovadas (BRASIL, 2008) são outros documentos relacionados a alegação de funcionalidade dos alimentos.

A definição proposta para alegação de propriedade funcional “é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo

humano” devendo, este alimento ou ingrediente, ser seguro para consumo sem supervisão médica.

Os alimentos funcionais podem ser considerados todos os alimentos e bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, trazem benefícios fisiológicos específicos pela presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDICO; CAMPOS, 2005; SILVA *et al.*, 2009). Devem estar apresentados na forma de alimentos comuns, sendo consumidos em dietas convencionais, porém demonstram capacidade de regular algumas funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA; SOUZA NETO; MAIA, 2003; MORAES; COLLA, 2006).

Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por mecanismos não previstos na nutrição convencional, devendo ser salientado que este efeito é restrito a promoção da saúde e não à cura de doenças (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

5 INGREDIENTES ALIMENTARES COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS

5.1 INULINA E OLIGOFRUTOSE

Os prebióticos foram inicialmente definidos como substâncias não digeríveis que quando consumidas proporcionam efeitos fisiológicos benéficos ao hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias selvagens (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Porém, a definição mais recente diz que prebióticos são ingredientes fermentados seletivamente que promovem alterações específicas na composição e/ou atividade da microflora gastrointestinal, proporcionando bem estar e saúde ao hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Alguns critérios foram estabelecidos para classificar um ingrediente alimentar como um prebiótico, dentre estes critérios estão a resistência à acidez gástrica, hidrólise enzimática e absorção gastrointestinal, fermentação pela microbiota intestinal e estímulo seletivo à multiplicação e/ou atividade dessas bactérias intestinais que contribuem para a saúde e bem-estar (SANTOS *et al.*, 2011). Vários ingredientes alimentares têm sido propostos como potenciais prebióticos, entretanto evidências científicas para o cumprimento dos pré-requisitos necessários para atender a essa classificação só existem para quatro ingredientes como inulina, oligofructose, lactulose e galacto-oligossacarídeos (ROBERFROID, 2008).

Quimicamente, os frutanos do tipo inulina são cadeias lineares de carboidratos, consistindo principalmente, se não exclusivamente, de ligações β -(2 \rightarrow 1)-frutosil-frutose, podendo conter uma molécula inicial de α -D-glicose. O grau de polimerização (GP) fica entre 2 a 60, com uma média igual a 12. A oligofructose, denominado de frutano de cadeia curta resulta da hidrólise parcial da inulina, sendo que seu GP varia entre 2 a 7, com média de 4 unidades (SANTOS *et al.*, 2011). Os termos oligofructose e fruto-oligossacarídeos (FOS) são considerados sinônimos para todos os oligômeros lineares de frutanos unidos por ligações β -(2 \rightarrow 1) com GP inferior a 10, porém os FOS tendem a descrever misturas de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (SAAD, 2006). A FIGURA 2.5 ilustra a estrutura simplificada da inulina e oligofructose.

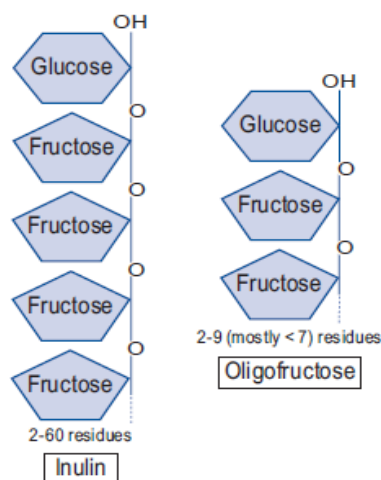


FIGURA 2.5 – ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA INULINA E OLIGOFRUTOSE
 FONTE: OLMSTEAD *et al.* (sem ano)

A suplementação de prebióticos estimula o predomínio de bifidobactérias no cólon, denominado de fator bifidogênico. Assim, ocorre estímulo do sistema imunológico reduzindo os níveis de bactérias patogênicas no intestino, melhorando os efeitos de constipação, reduzindo o risco de osteoporose devido ao aumento na absorção de cálcio. Paralelamente, há uma diminuição no risco de aterosclerose pela diminuição na síntese de triglicerídeos e ácidos graxos do fígado e a nível sanguíneo (KAUR; GUPTA, 2002; DALLA CORTE, 2008).

Entre as ações dos prebióticos está o fortalecimento da normobiose pela modificação seletiva na composição da microbiota intestinal, melhoria na formação das fezes devido ao aumento da capacidade de retenção de água e gelificação do material fecal, promove efeitos fisiológicos benéficos tanto no cólon quanto em outras regiões extra-intestinais e redução no risco de disbiose assim como patologias sistêmicas associadas ao intestino (ESPIRITO SANTO *et al.*, 2011).

O prebiótico oligofrutose pode ser utilizado como substituto de açúcar e a inulina como substituto de gordura como um meio de melhorar a textura, estabilizar espuma ou melhorar a sensação tátil bucal, promovida por produtos lácteos fermentados, sobremesas como gelatinas e sorvetes, produtos de panificação como biscoitos, pães e cereais como as fórmulas infantis (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012).

Como a inulina possui uma cadeia polimérica maior, em relação à oligofrutose, apresenta menor solubilidade e habilidade de formar microcristais

quando misturada em água ou leite. Estes microcristais, embora não percebidos na boca, interagem formando uma textura finamente cremosa que promovem sensorialmente semelhança à gordura (NINESS, 1999; OLIVEIRA, 2010). Como exemplo, há o emprego da inulina como substituto de gordura em pães e em produtos cárneos. Em sorvetes com reduzido conteúdo de gordura, a adição da inulina resultou em aumento na viscosidade, diminuição no ponto de congelamento e uma melhora nas propriedades sensoriais (MIGUEL, 2009).

Na forma pura, a oligofrutose apresenta um dulçor de 30 a 35% comparado à sacarose, consequentemente, sua utilização como substitutos de açúcar, é reduzida, sendo freqüente a combinação com edulcorantes para obtenção dos níveis de doçura desejáveis e mascarar possíveis sabores residuais. Devido a sua massa molecular, possui capacidade de aumento de viscosidade, melhorando o corpo, estabilidade e sabor de produtos lácteos. Possui ainda outras propriedades tecnológicas como, por exemplo, alta capacidade de retenção de água, inibição da retrogradação do amido, amaciantes, umectantes, aglutinantes e não cariogênicos (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012).

5.2 CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

O soro de leite é reconhecido como um dos mais versáteis coprodutos da indústria de alimentos e uma fonte útil de proteínas de alta qualidade nutricional e funcional (BALDISSERA *et al.*, 2011).

O conjunto de proteínas do soro de leite bovino é representado pela β -lactoglobulina (ca.35-55%), α -lactoalbumina (ca.12-24%), albumina do soro bovino (ca. 5%), imunoglobulinas (ca.8-15%), peptídeos derivados da caseína e outras em menores proporções (ANTUNES, 2003).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do soro de leite têm sido consideradas superiores à caseína, devido à semelhança com o perfil de aminoácidos do leite humano e à evidência de maior digestão e absorção das proteínas do soro, quando comparada às caseínas. Todas as proteínas do soro podem resultar em peptídeos bioativos durante a digestão ao longo do TGI, pela ação de proteases digestivas ou microbianas, ou mesmo por enzimas de culturas

starter. Esses peptídeos derivados do soro estão associados à modulação de várias funções fisiológicas, como pressão sanguínea, processos inflamatórios, resposta glicêmica e insulinêmica, fome e saciedade (BURITI, 2008). O soro de leite pode ter uma importante contribuição na nutrição esportiva (altos níveis de aminoácidos essenciais), controle de peso corporal (reguladores do metabolismo lipídico), saúde cardíaca e construção óssea (BALDISSERA *et al.*, 2011).

Proteínas do soro são frequentemente utilizadas como ingredientes alimentares, devido ao seu alto valor nutritivo e também por serem considerados compostos GRAS. A β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina representa aproximadamente 70% das proteínas totais do soro e são responsáveis pela hidratação, gelificação e propriedades de emulsificação e formação de espuma dos ingredientes de proteínas do soro (SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004).

Os ingredientes alimentícios derivados das proteínas do soro são classificados como “concentrados”, quando o teor proteico total for de 25-80%, ou como “isolados” quando o teor proteico for superior a 90%. Os concentrados proteicos de soro (CPS) são produtos derivados do soro de leite do qual a água, minerais e lactose foram retirados (VIDIGAL, 2009). O CPS tem se mostrado um insumo interessante devido às suas propriedades funcionais como gelificação, aumento de viscosidade (VIDIGAL *et al.*, 2012), solubilidade, adesão, emulsificação e aeração (EMAM-DJOME *et al.*, 2008).

Quanto à aplicabilidade os CPS são empregados como substitutos de gordura e, por apresentarem alta capacidade de retenção de água colaboram para a manutenção de umidade ao longo do armazenamento de produtos com teor lipídico reduzido (LOBATO-CALLEROS *et al.* 2007). As proteínas são constituídas por partículas uniformes e esféricas, permitindo o deslizamento de uma partícula sobre as outras e oferece, durante a degustação, a sensação de cremosidade semelhante à da gordura (VIDIGAL, 2009).

Além disso, os CPS possuem também aplicações na indústria de laticínios, como em sorvetes, iogurtes, bebidas lácteas, cremes e queijos (SILVA, BOLINI, ANTUNES, 2004). Os CPS com 50, 65 e 80% de proteína são apropriados para uso em bebidas nutricionais, sopas, produtos de panificação, produtos cárneos, alimentos dietéticos, produtos com reduzido teor de gordura e em bebidas fortificadas (VIDIGAL, 2009).

5.3 EXTRATO DE SOJA

Há algum tempo a soja (*Glicine max*) vem despertando grande interesse por parte dos pesquisadores em decorrência de uma correlação positiva entre o seu consumo e os diversos efeitos benéficos à saúde (ROSSI *et al.*, 2004).

A soja é considerada uma excelente fonte proteica, com uma das melhores composições de aminoácidos essenciais entre as proteínas de origem vegetal e alta digestibilidade (92-100%), também possui em sua composição compostos com ação antioxidante como tocoferóis, fosfolipídeos, aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular (MORAES *et al.*, 2009). As características químicas e nutricionais qualificam a soja como um alimento funcional, pois além da qualidade de sua proteína, pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas de menopausa (SILVA *et al.*, 2009). O QUADRO 2.8 apresenta os constituintes, presentes na soja, com propriedades funcionais.

Constituintes	Função Fisiológica
Isoflavonas	Inibição da proliferação de células cancerígenas Inibição de osteoporose Inibição da síndrome da menopausa Prevenção de diabetes
Saponina	Antioxidante Inibição do desenvolvimento de tumores Prevenção de esclerose arterial
Lecitina	Redução do colesterol Prevenção de envelhecimento celular Ativadora de células cerebrais
Vitamina E	Antioxidante
Oligossacarídeos	Prebiótico intestinal
Proteínas e Peptídeos bioativos	Redução do colesterol Redução da obesidade Imunomoduladores Antioxidantes Redução da pressão sanguínea Prevenção de câncer de pele
Fibras alimentares	Prebiótico intestinal Inibição do câncer intestinal
Cálcio	Prevenção de osteoporose
Inibidor de protease (tripsina)	Prevenção de diabetes Atividade anticarcinogênica e anti-inflamatória

QUADRO 2.8 – CONSTITUINTES PRESENTES NA SOJA, COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS

FONTE: Adaptado de MORAES *et al.* (2009) e CALLOU (2009)

No Brasil, considerado, segundo maior produtor de soja do mundo, a produção na safra 2010/2011 foi de 75,0 milhões de toneladas representando 28,44% da produção mundial, este valor ultrapassa em 8,0% a produção recorde de 69,0 milhões de toneladas obtida na safra 2009/2010. O estado do Paraná produziu na safra 2010/2011, 15,4 milhões de toneladas e permanece como segundo lugar nacional na produção do grão (EMBRAPA, 2012). Deste total produzido, 44% seguem para exportação na forma *in natura*, 7% permanecem nos estoques e 49% é encaminhado para o processamento dos mais variados produtos, como farelo, óleo de soja refinado, lecitina, proteína texturizada de soja e concentrado proteico de soja (APROSOJA/MT, 2012).

A soja e seus derivados oferecem excelentes possibilidades para serem empregados sob as mais variadas formas, no processamento de produtos alimentícios destinados ao consumo humano, com melhor valor nutritivo e custos reduzidos (MORAES *et al.* 2009). Entretanto, alguns fatores ainda limitam a aceitação da soja em grão e de seus derivados, como os compostos causadores de flatulência e seu aroma e sabor característicos (RODRIGUES; MORETTI, 2008). O extrato aquoso de soja (EAS), popularmente denominado de “leite” de soja, é o produto de maior aceitação pelos consumidores ocidentais (ROSSI *et al.*, 2011).

Inicialmente, o EAS foi definido como “produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja, convenientemente limpos, seguido de processamento tecnológico adequado, adicionado ou não de ingredientes opcionais permitidos, podendo ser submetido à desidratação total ou parcial” pela Comissão Nacional de Normas para Alimentos (CNNPA) por meio da Resolução nº 14 de 28 de junho de 1978 (BRASIL, 1978). Entretanto esta legislação foi revogada pela Resolução RDC nº 268 de 22 de setembro de 2005 que trata do “Regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal” que define que produtos proteicos de origem vegetal são alimentos obtidos a partir de partes proteicas de espécie(s) vegetal (is), podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas com exceção daquelas não convencionais para alimentos, e como requisito específico, o teor protéico mínimo de 40,0 e 3,0% (g.100g^{-1}) para extrato de soja na forma de pó e aquoso, respectivamente (BRASIL, 2005).

A composição do extrato de soja em pó está diretamente relacionada com a variedade de soja empregada e com a forma como a matéria-prima é utilizada, pois

alguns fabricantes adotam o farelo desengordurado de soja e outros a soja na sua forma *in natura*, para obtenção do extrato de soja em pó. Da mesma forma, a variação na composição do EAS é inerente as condições como variedade e composição da matéria-prima e características do processamento (MORAES *et al.*, 2009). A TABELA 2.1 apresenta a composição centesimal, de vitaminas e minerais do extrato de soja em pó e do EAS.

TABELA 2.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, DE VITAMINAS E MINERAIS DO EXTRATO DE SOJA EM PÓ E DO EXTRATO AQUOSO DE SOJA

Composição	Extrato de soja em pó	Extrato aquoso de soja
Umidade (%)	4,5	91,3
Proteínas (g)	35,7	2,4
Lipídios (g)	26,2	1,6
Ácidos graxos saturados (g)	3,3	0,2
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	6,4	0,3
Ácidos graxos polinsaturados (g)	12,9	0,6
Carboidratos (g)	28,5	4,3
Fibra alimentar (g)	7,3	0,4
Cinzas (g)	5,2	0,5
Cálcio (mg)	359,0	17,0
Magnésio (mg)	216,0	15,0
Manganês (mg)	2,7	0,1
Fósforo (mg)	647,0	53,0
Ferro (mg)	7,0	0,4
Sódio (mg)	83,0	57,0
Potássio (mg)	1607,0	121,0
Cobre (mg)	1,2	0,1
Zinco (mg)	5,8	0,3
Tiamina (mg)	Traços	Traços
Riboflavina (mg)	0,1	Traços
Piridoxina (mg)	0,3	Traços
Niacina (mg)	Traços	Traços
Vitamina C (mg)	9,2	Traços

FONTE: TACO (2011)

O EAS é reconhecido pelo seu alto valor nutricional devido as suas proteínas de qualidade, mas também por conter isoflavonas, que são compostos bioativos que têm sido amplamente associados com a prevenção de doenças crônicas, como arteriosclerose, câncer, osteoporose e desordens decorrentes da menopausa (EWE *et al.*, 2012).

As isoflavonas têm sido genericamente conhecidas como fitoestrógenos, por possuírem estrutura química semelhante ao 17- β -estradiol e, desta forma, apresentam habilidade de mimetizar a ação dos estrógenos. São predominantemente encontradas em leguminosas e mais abundantes na soja, porém em concentrações variáveis, pois dependem da qualidade do grão, das

condições de crescimento, tipo de solo e do seu processamento (NISSOLA *et al.*, 2010).

De acordo com Moraes *et al.* (2009) a soja possui três tipos de isoflavonas, cada uma em quatro formas químicas diferentes (aglicona, glicosilada, glicosilada conjugada com grupamento acetil e glicosilada conjugada com grupamento malonil) totalizando 12 isômeros. As formas agliconas são chamadas de daidzeína, genisteína e gliciteína. Quando glicosiladas, ou seja, na forma de β -glicosídeos, são chamadas de daidzina, genistina e glicitina. Existem também as isoflavonas β -glicosídicas conjugadas que podem ser classificadas em acetil glicosídeo (acetil daidzina, acetil genistina e malonil glicitina) e malonil glicosídeo (malonil daidzina, malonil genistina e malonil glicitina).

A FIGURA 2.6 apresenta as estruturas químicas das isoflavonas em sua forma glicosilada (A) e aglicona (B).

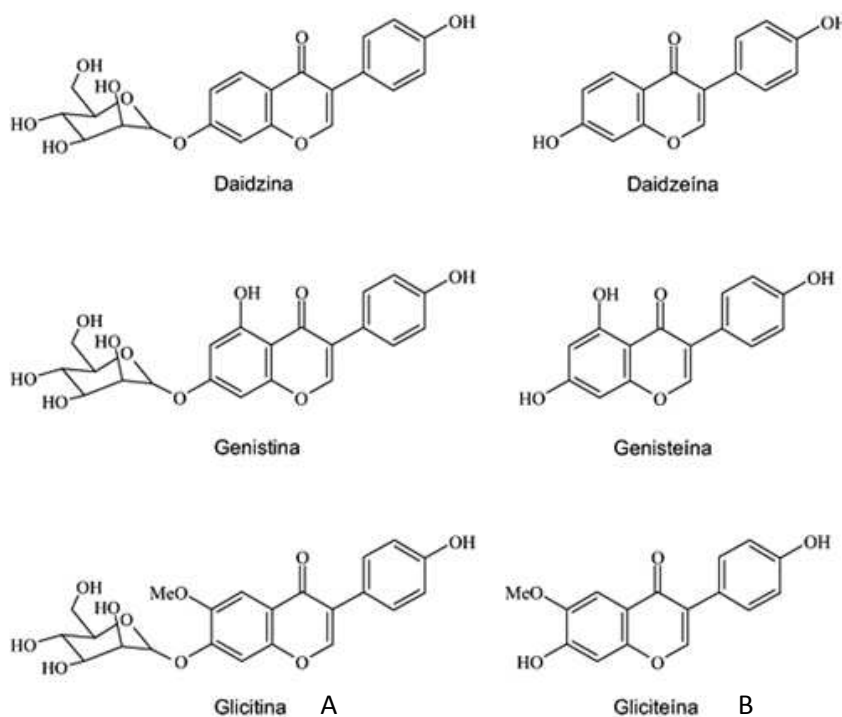


FIGURA 2.6 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS ISOFLAVONAS EM SUAS FORMAS: (A) GLICOSILADA E (B) AGLICONA
FONTE: CÉSAR *et al.* (2007)

A soja contém isoflavonas em sua maior parte na forma malonil e glicosil, mas quando submetida a processos industriais, como fermentação simples, as

quantidades de isoflavonas glicosiladas continuam altas, porém já é possível identificar a formação de isoflavonas agliconas (MORAES *et al.*, 2009). Tanto na soja quanto em alimentos de soja não fermentados, as isoflavonas são encontradas em concentrações que variam de 1,0 a 50,0 mg.Kg⁻¹ como glicosídeos conjugados biologicamente inativos, o que compreende 80 a 95% do teor de isoflavonas (MUTHYALA *et al.*, 2004; VIJ; HATI; YADAV, 2011).

A atividade biológica e o metabolismo das isoflavonas ingeridas na dieta dependem da forma química em que se apresentam, após a ingestão as formas malonil e acetil glicosídicas são metabolizadas a β -glicosídeos, os quais sofrem hidrólise pelas β -glicosidases produzidas pelas bactérias intestinais, havendo a liberação de glicose e agliconas (MORAES *et al.*, 2009). Somente as formas agliconas ou seus produtos metabólicos são absorvidos pela barreira epitelial do intestino, a qual ocorre passivamente via micelas, e após a absorção, estas moléculas são incorporadas nos quilomícrons, que as transportam ao sistema linfático antes de entrar no sistema circulatório (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; SILVA *et al.*, 2009).

O processo de fermentação aumenta a concentração de aglicona devido à atividade microbiana e pode aumentar a biodisponibilidade das isoflavonas agliconas quando ingeridas por humanos (HARON *et al.*, 2009).

Além das isoflavonas, os oligossacarídeos presentes naturalmente na soja, como a estaquiose e rafinose, não são degradados pelas enzimas digestivas humanas. Estes carboidratos podem servir como substrato para micro-organismos no cólon, estimulando a multiplicação de bactérias benéficas e aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta e a eliminação fecal de lipídios (BANG; CHIO; KIM, 2007). Entretanto a atividade de β -galactosidase produzida pela microbiota intestinal pode causar distúrbios intestinais, como flatulência em pessoas mais sensíveis (ROSSI *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

- AHMED Z.; WANG, Y.; CHENG, Q.; IMRAN, M. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.2843-2850, 2010.
- ALBANO, H.; TODOROV, S.D.; VAN REENEN, C. A.; HOOG, T.; DICKS, L.; TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p. 239-247, 2007.
- ALTUNTAS, E.G.; COSANSU, S.; AYHAN, K. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.28-31, 2010.
- ANASTASIADOU, S.; PAPAGIANNI, M.; FILIOUSIS, G.; AMBROSIADIS, J.; KOIDIS, P. Pediocin SA-1 an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. **Bioresource Technology**, v.99, p.5384-5390, 2008.
- ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.
- APROSOJA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE SOJA/ MATO GROSSO. **Os usos da soja: destino e uso da soja brasileira**. Disponível em:<<http://www.aprosoja.com.br/sobre-a-soja>> Acesso em: 03/11/12.
- AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds.) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993.
- AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004.
- BADARÓ, A.C.L.; GUTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V.; STRINGHETA, P.C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana - parte 1. **Revista Digital de Nutrição**, v.2, p.1-27, 2008. Disponível em:<<http://www.unilestemg.br/nutrirgerais>>. Acesso em: 10/05/12.
- BALDISSERA, A.C.; DELLA BETTA, F.; PENNA, A.L.B.; LINDNER, J.D.D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.1497-1512, 2011.
- BANG, M.H.; CHIO, O.S.; KIM, W.K.O. Soyoligosacharide increases fecal bifidobacteria counts, short-chain fatty acids, and fecal lipid concentrations in young Korean women. **Journal of Medicinal Food**, v.10, p.366-370, 2007.
- BELLENGIER, P.; RICHARD, J.; FOUCAUD, C. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.1520-1527, 1997.

BIK, E.M.; ECKBURG, P.B.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; PURDOM, E.A.; FRANCOIS, F.; PEREZ-PEREZ, G.; BLASER, M.J.; RELMAN, D.A. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p.732-737, 2006.

BONOMO, M.G.; RICCIARDI, A.; ZOTTA, E.; PARENTE G.; SALZANO, G. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). **Meat Science**, v.80, p.1238-1248, 2008.

BOTAZZI, V. An introduction to rod-shaped lactic-acid bacteria. **Biochemie**, v.70, p.303-315, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Padrão de identidade e qualidade para farinha desengordurada de soja, proteína texturizada de soja, proteína concentrada de soja, proteína isolada de soja e extrato de soja. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 jun. de 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 mai. de 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico de procedimento para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 mai. de 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 jan. de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão técnico-científica de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 24/05/2011.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, p.373-380 2007.

BURITI, F.C.A. **Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro***. 144 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CALDER, P.C.; KEWS, S. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, v.88, spl.1, p.S165-S176, 2002.

CALLOU, K.R. de A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja**. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2009.

CÂNDICO, L.M.B; CAMPOS, A.M. Alimentos funcionais: uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 29, p.193-203, 2005.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, s/p., 2002.

CAUFIELD, P.W.; LI, Y.; DASANAYAKE, A.; SAXENA, D. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. **Caries Research**, v.41, p.2-8, 2007.

CÉSAR, I. da C.; BRAGA, F.C.; VIANNA-SOARES C.D.; NUNAN, E.de A.; BARBOSA, T.A.F. MOREIRA-CAMPOS, L.M. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.616-625, 2007.

COELHO, L.F. **Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico**. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. **Microbiology**, v.149 p.3507-3517, 2003.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. **Letters in Applied Microbiology**, v.45 p.454-460, 2007.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v.226, p.1065-1073, 2008.

DALLA CORTE, F.F. **Desenvolvimento de frozen yogurt com propriedades funcionais**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

DANIELSEN, M. SIMPSON, P.J.; O'CONNOR, E.B.; ROSS, R.P.; STANTN, C. Susceptibility of *Pediococcus spp.* to antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.384-389, 2007.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2804-2816, 1998.

DE BRUYNE, K.; FRANZ, C.M.A.P.; VANCANNEYT, M.; SCHILLINGER, U.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. de; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. *Pediococcus argentinicus* sp. nov., from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA*

and *atpA* sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2909-2916, 2008.

DERAZ, S.; KARLSSON, N.E.; KHALIL, A.A.; MATTIASSON, B. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potencial probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.373-379, 2007.

DOBSON, C.M.; DENEER, H.; LEE, S.; HEMMINGSEN, S.; GLAZE, S; ZIOLA B. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic bacterium isolated from beer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.2003-2010, 2002.

DOI, K.; NISHIZAKI, Y.; FUJINO, Y.; OHSHIMA, T.; OHMOMO, S.; OGATA, S. *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p. 1007-1010, 2009.

DU PLESSIS, E.M.; DICKS, L.M.T.; VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. *Lactobacillus acidophilus* and related species: a review. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.46, p.319-340, 1996.

EMAM-DJOME, Z.; MOUSAVI, M.E.; GHORBANI, A.V.; MADADLOU, A. Effect of whey protein concentrate addition on the physical properties of homogenized sweetened dairy creams. **International Journal of Dairy Technology**, v.61, p.183-191, 2008.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números (safra 2010/2011)**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>> Acesso em: 03/11/2102.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISAHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.85-106, 2000.

ESPÍRITO SANTO, A.P. do; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Influence of food matrices on probiotic viability – a review focusing on the fruity bases. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.377-385, 2011.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutrição**, v.14, p.43-52, 2001.

EWE, J.A.; ABDULLAH, W.N.W.; BHAT, R.; KARIM, A.A.; LIONG, M.T. Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.160-173, 2012.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada, 2002.

FRANZ, C.M.A.P.; VANCANNEYT, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; DE WACHTER, M.; CLEENWERCK, I.; HOSTE, B.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.H.; SWINGS, J. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p. 329-333, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GARVIE, E.I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiology Reviews**, v.44, p.106-139, 1980.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GRIMOUD, J.; DURAND, H.; COURTIN, C.; MONSAN, P.; OUARNÉ, F.; THEODOROU, V.; ROQUES, C. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. **Anaerobe**, v.16, p.493-500, 2010.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Bacterial flora of the digestive tract. **Gastroenterology and Hepatology**, v.36, p.1-5, 2003.

GURIRA, O.Z.; BUYS, E.M. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. **Food Microbiology**, v.22 p.159-168, 2005.

HAAKENSEN, M.; DOBSON, C.M.; HILL, J.E.; ZIOLA, B. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (approved lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p. 615-621, 2009.

HARON, H.; ISMAIL, A.; AZLAN, A.; SHAHAR, S.; PENG, L.S. Daidzein and genestein contents in tempeh and selected soy products. **Food Chemistry**, v.115, p.1350-1356, 2009.

HASSAN, A.N.; FRANK J.F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**, 2.ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HENSON, S. MASAKURE, O.; CRANFIELD, J. The propensity for consumers to offset health risks through the use of functional foods and nutraceuticals: the case of lycopene. **Food Quality and Preference**, v.19, p. 395-406, 2008.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; MUTHAIYAN, A.; MORENO, F.J.; MONTILLA, A.; SANZ, M.L.; RICKE, S.C. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. **Food Microbiology**, v.30, p.355-361, 2012.

HOLZAPFEL, W.H.; WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: WOOD, B.J.B; HOLZAPFEL, W.H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Champman & Hall, 1995.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUISIN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.85-101, 1998.

HOOPER, L.V.; STAPPENBECK T.S.; HONG, C.V.; GORDON, J.I. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. **Nature Immunology**, v.4, p.269-273, 2003.

HOUARAU, C.; LAGARINE, C.; MARTIN, L.; VELGE-ROUSSEL, F.; LABRANCHU, Y. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.17, p.696-702, 2006.

HUANG, J.; LACROIX, C.; DABA, H.; SIMARD, R.E. Pediocin 5 production and plasmid stability during continuous free and immobilized cell cultures of *Pediococcus acidilactici* UL5. **Journal Applied Bacteriology**, v.80, p.635-644, 1996.

HUTKINS, R.W. **Microbiology and technology of fermented foods**. 1.ed. Ames: Blackwell, 2006.

IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice: review. **Clinical Nutrition**, v.29, p.701-725, 2010.

ILSI. INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE. Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria. ILSI North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, p.2-3-316, 1999.

INÊS, A.F.H. **Abordagem polifásica na caracterização e seleção de bactérias do ácido láctico de vinhos da região Demarcada do Douro**. 198 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2007.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho – parte 1. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23, p.81-96, 2008.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, p.299-313, 2004.

JAFAREI, P.; EBRAHIMI, M.T. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. **African Journal of Microbiology Research**, v.54, p.4033-4042, 2011.

JONES, P.J.; JEW, S. Functional food development: concept to reality. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, p.387-390, 2007.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.49, p.209-224, 1983.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potencial pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p.1-9, 2002.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v.27, p.703-714, 2002.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.

KLAENHAMMER, T.R.; ALTERMANN, E.; PFEILER, E.; BLUCK, B.L.; GOH, Y.J.; O'FLAHERTY, S.; BARRANGOU, R.; DUONG, T. Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*. **Journal Clinical Gastroenterology**, v.42, S160, 2008.

KLAENHAMMER, T.R.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.; AZCARATE-PERIL M.A.; ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.393-409, 2005.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41 p.103-125, 1998.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, p.229-347, 2008.

KOOP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic use of probiotics: a review. **Journal of American Dietetic Association**, v.101, p.229-214, 2001.

LIN, C.K.; TSAI, H.C.; LIN, P.P.; TSEN, H.Y.; TSAI, C.C. *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. **Anaerobe**, v.14, p.251-255, 2008.

LIU, S.Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p. 115-131, 2003.

LIU, L.; ZHANG, B.; TONG, H.; DONG, X. *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2405-2408, 2006.

LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v.7, p.73-90, 2006.

LOBATO-CALLEROS, C.; REYES-HERNÁNDEZ, J.; BERISTANI, C.I.; HORNELAS-URIBE, Y.; SÁNCHEZ-GARCÍA, J.E.; VERNON-CARTER, E.J. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. **Food Research International**, v.40, p.529-537, 2007.

LUND, B.; EDLUND, C. Probiotic *Enterococcus faecium* strains is a possible recipient of the vanA gene cluster. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p.1384-1385, 2001.

MALGANHA, L.C. **Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado**. 62 f. Dissertação (Mestrado e Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

MADSEN, K.; CORNISH, A.; SOPER, P.; McKAIGNEY, C.; JIJON, H.; YACHIMEC, C.; DOYLE, J.; JEWELL, L.; DE SIMONE, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v.121, p.580-591, 2001.

MEDDINGS, J. The significance of the gut barrier in disease. **Gut**, v.57, p.438-440, 2008.

MENAR, S.; CANDALH, C.; BAMBOU, J.C.; TERPEND, K.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. **Gut**, v.53, p.821-828, 2004.

MIGUEL, D.P. **Desenvolvimento de sorvete de iogurte simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014**. 118 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.32, p.109-122, 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php>> Acesso em: 02/04/12.

MORAES, C.S.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H.; PARK, Y.K. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

MUTHYALA, R.S.; JU, Y.H.; SHENG, S.L.D.; WILLIAMS, L. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. **Biorganic and Medicine Chemistry**, v.12, p.1559-1567, 2004.

NG, S.C.; HART, A.L.; KAMM, M.A.; STAGG, A.J.; KNIGHT, S.C Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.15, p.300-310, 2009.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v.129, p.1402-1406, 1999.

NISSOLA, C.; HESS, B.; FRANCISCO, T.G.; GASPARETTO, C.; CAMPOS, F.R.; PONTAROLO, R. Determinação de genisteína e genistina por espectrofotometria de UV-Visível em extratos secos de soja utilizados como matéria prima em farmácia de manipulação. **Visão Acadêmica**, v.11, p.35-41, 2010.

OGIER, J.C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganism: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.291-301, 2008.

OLIVEIRA, R.P.de S. **O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado**. 170 f. Tese (Doutorado e Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLMSTEAD, S.; WOLFSON, D.; MEISS, D.; RALSTON, J. **Understanding prebiotics**. Klaire Labs: technical summary, p.1-8, s/a (sem ano). Disponível em: <<http://www.klaire.com>> Acesso: 05/04/12.

O'TOOLE, P.W.; COONEY, J.C. Probiotic bacteria influence the composition and functional of the intestinal microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease**, s/v, p. 1-9, 2008.

PAN, X.; CHEN, F.; WU, T.; TANG, H.; ZHAO, Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**, v.20, p.598-602, 2009.

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S.; Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.514-522, 2009.

PAROLO, C.C.F. **Estudo dos lactobacilos no biofilme dental**. 163 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PERES, C.M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v.36, p.31-42, 2012.

PIMENTEL, T.C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S.H. Aspectos funcionais, de saúde e tecnológicos de frutanos tipo inulina. **Boletim do CEPPA**, v.30, p.103-118, 2012.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de côco**. 163 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

QUIGLEY E.M.M.; QUERA, R. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics prebiotics, and probiotics. **Gastroenterology**, v.130, p.S78-S90, 2006.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. **Environmental Microbiology**, v.9, p.2125-2136, 2007.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v.43, p.1-7, 2010.

RAUCH, M.; LYNCH, S.V. The potencial for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, p.1-10, 2011.

RAY, B.; HOOVER, D.G. Pediocins. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. San Diego: Academic Press, 1993.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p.1-11, 2010.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137, p.830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC, 2008.

ROBERFROID, M., GIBSON, G.; HOYLES, L. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.S1- S63, 2010

RODRIGUES, R.S.; MORETTI, R.H. Caracterização físico-química de bebida protéica elaborada com extrato de soja e polpa de pêssegos. **Boletim do CEPPA**, v.26, p.101-110, 2008.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. The potencial effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT- Food Science Technology**, v. 44, p.100-108, 2011.

RODRIGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUES, J.L.; RODRIGUEZ, J.M.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, v.15, p.51-57, 2005.

ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; POETA, P.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.234-240, 2006.

ROSSI, E.A.; CAVALLINI, D.C.U.; MANZONI, M.S.J.; ROSSI, P.R. Produtos probióticos e prebióticos à base de soja. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G. da; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

ROSSI, E.A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A.R.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; ABDALLA, D.S.P.; TALARICO, V.H.; MINTO, D.F. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p.93-99, 2004.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, v.42, p.1-6, 2006.

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; DA CRUZ, A.G.; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2011.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p.1-16, 2013.

SACCARO, D.M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 1998.

SANDERS, M.E.; GIBSON, G.R.; GILL, H.; GUARNER, F. Probiotic in food: their potencial to impact human health. **Council for Agricultural Science and Technology**, 2007.

SANTOS, R. dos; NETTO, C.C.; MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Biotecnologia aplicada à produção de prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G. da; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**, 1.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

SARTOR, R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v.3, p.390-407, 2006.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotics approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.361-364, 2001.

SCHVED, F.; LALAZAR, Y.; HENIS, Y.; JUVEN, B.J. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Journal Applied Bacteriology**, v.74, p.67-77, 1993.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v.27, p.691-697, 2010.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A.; ANTUNES, A.J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p.187-196, 2004.

SILVA, M.C. P. da; LADEIRA, A.M.; GARCIA, D.; FURLAN, M.R. Isoflavona. **Thesis**, s/v, p.31-59, 2009.

SILVEIRA, T.F.V. da; VIANNA, C.M.de M.; MOSEGUI, G.B.G. Brazilian legislation for functional. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v.19, p.1189-1202, 2009.

SOUZA OLIVEIRA, R.P. de. **O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado**. 189 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.37, p.127-135, 2003.

SPREER, E.; MIXA, A. **Milk and dairy product technology**. New York: Marcel Dekker, 1998. 483p.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p.1-29, 1997.

STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43 p.181-194, 2007.

TACO. **TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS**. NEPA/UNICAMP. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

TAMANG, J.P.; TAMANG, B.; SCHILLINGER, U.; FRANZ, C.M.A.P.; GORES, M.; HOLZAPFEL, W.H. Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.347-356, 2005.

TANASUPAWAT, S.; OKADA, S.; KOZAKI, M.; KOMAGATA, K. Characterization of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* strains and replacement of the type strain of *P. acidilactici* with the proposed neotype DSM 20284. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.860-863, 1993.

TANASUPAWAT, S.; PAKDEETO, A.; THAWAI, C.; YUKPHAN, P.; OKADA, S. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. **Journal General Applied Microbiology**, v.53, p.7-15, 2007.

TEUSINK, B.; SMID, E.J. Modeling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.46-56, 2006.

TRABULSI, L.R. Flora intestinal, probióticos, prebióticos e simbióticos. In: Os probióticos e a saúde infantil. **Temas de Pediatria**, nº Especial, Nestlé – Nutrição Infantil, p.5-8, 2 000.

TURRONI, F.; RIBBERA, A.; FORONI, E.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.94 p.35-50, 2008.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

VASILEJIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – from Metchnikof to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714-728, 2008.

VIDIGAL, M.C.T.R. **Caracterização reológica e sensorial de sobremesa láctea diet contendo concentrado protéico de soro**. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

VIDIGAL, M.C.T.R.; MINIM, V.P.R.; BERGER, E.C.; RAMOS, A.M.; MINIM, L.A. Concentrado protéico de soro melhora a qualidade sensorial de sobremesa láctea diet. **Ciência Rural**, v. 14, s/p., 2012.

VIJ, S.; HATI, S.; YADAV, D. Biofunctionality of probiotic soy yoghurt. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.502-509, 2011.

VINDEROLA, G.C.; MOCCHUITTI, P. REINHEIMER, A.J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.85, p. 721-729, 2002.

VUYST, L. de.; TSAKALIDOU, E. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. **International Dairy Journal**, v.18, p.476-485, 2008.

WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p. 3-10, 2010.

YULIANA, N.; GARCIA, V.V. Influence of *Pediococcus acidilactici* as a starter on the flavor of tempoyak (fermented durian). **Indian Journal of Biotechnology**, v.8, p.304-310, 2009.

ZHANG, B.; TONG, H.; DONG, X. *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2167-2170, 2005.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotic, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, p.473-479, 1998.

CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS E SELECIONADAS DE MATÉRIAS-PRIMAS DE ORIGEM VEGETAL

RESUMO

As bactérias ácido lácticas podem ser encontradas na natureza em ambientes variados, como no trato gastrointestinal de humanos e animais, alimentos de origem animal como leite e carne e em produtos de origem vegetal. O objetivo do presente estudo foi caracterizar e identificar bactérias ácido lácticas isoladas e selecionadas de matérias-primas de origem vegetal. Diferentes vegetais, entre folhas e frutas, foram empregados como matéria-prima para o isolamento destas bactérias. Os cultivos selecionados foram submetidos à pesquisa presumtiva de enterococos e para alguns fatores de patogenicidade. As cepas foram avaliadas quanto a algumas propriedades de interesse tecnológico como resistência em presença dos sais cloreto e nitrito de sódio, potencial qualitativo de formação de aroma, capacidade de acidificação e hidrólise da caseína em leite desnatado reconstituído. Os cultivos avaliados foram submetidos à identificação por métodos moleculares. De 63 isolados avaliados, somente 21% foram selecionados como bactérias ácido lácticas. Dos 13 cultivos selecionados, 9 estirpes classificadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus* e apresentaram atividade β -hemolítica. Para as 4 cepas, que não apresentaram fator de patogenicidade e não foram classificadas como enterococos, foram avaliadas as propriedades de interesse tecnológico demonstrando capacidade de crescimento frente as condições de 2,5, 4,0 e 6,0% de cloreto de sódio e de 80, 100, 120 e 200 mg.L⁻¹ de nitrito de sódio. A capacidade de acidificação foi determinada como média e lenta e a velocidade máxima de variação do pH, devido a produção de ácido láctico, variou de 0,07 a 0,105 dpH.h⁻¹. O teor de L-tirosina, liberado pela hidrólise da caseína após 24 h de fermentação, variou de 66,0 a 195,7 mg.L⁻¹. Os cultivos submetidos à identificação molecular foram definidos como *Pediococcus acidilactici* com o máximo de 96,3% de índice de confirmação. Os resultados, quanto à avaliação das propriedades de interesse tecnológico, indicaram que as linhagens (B14, B17 e B16), identificadas como *Pediococcus acidilactici*, apresentaram potencial para aplicação em produtos cárneos fermentados (cultura *starter*) e produtos lácteos (culturas proteolíticas). Portanto, devido os resultados obtidos para o potencial de aplicação tecnológica, foi considerado pertinente avaliar o potencial probiótico da linhagem (B14) que apresentou maior índice de confirmação molecular.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas. Isolamento. Identificação molecular. *Pediococcus acidilactici*. Matérias-primas vegetais.

1 INTRODUÇÃO

O termo bactérias ácido lácticas (BAL) descreve um grupo de micro-organismos procariontes e heterogêneo, porém têm em comum características como serem *Gram*-positivos, catalase negativos, não esporulados (POTES; MARINHO, 2007) e que preferem condições anaeróbias, mas são aerotolerantes, fastidiosos, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos, produzindo ácido láctico como produto do metabolismo primário (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

De acordo com a taxonomia atual, este grupo consiste de 12 gêneros, sendo *Lactobacillus* (Lb.), *Lactococcus* (Lac.), *Leuconostoc* (L.), *Oenococcus* (O.), *Pediococcus* (P.), *Streptococcus* (S.) *Tetragenococcus* (T.), *Aerococcus* (A.), *Carnobacterium* (C.), *Enterococcus* (E.), *Vagococcus* (V.) e *Weissella* (W.) (HUTKINS, 2006). Embora o gênero *Bifidobacterium* (B.) não pertença filogeneticamente ao grupo das BAL apresenta propriedades fisiológicas e bioquímicas típicas destas bactérias, portanto as bifidobactérias são ainda consideradas uma parte deste grupo (STILES; HOLZAPFEL, 1997; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Devido ao longo histórico de consumo em alimentos fermentados, as BAL são organismos reconhecidos como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (ALBANO *et al.*, 2009). Entretanto, existem alguns casos relatados na literatura de infecções sistêmicas como endocardite, sepse ou septicemia e bacteremia causadas por estas bactérias (LJUNGH; WADSTRÖM, 2006).

As BAL são amplamente distribuídas na natureza e predominam na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como leite, queijo, carne, frutas e vegetais (LÓPEZ-DIAS *et al.*, 2000). São comumente encontradas em produtos fermentados como repolho e cereais, vegetais em conserva ou em muitos tipos de alimentos e bebidas asiáticos (FOLIGNÉ *et al.*, 2010). A participação das BAL em alimentos fermentados está associada as suas características fisiológicas como utilização de substrato, capacidade metabólica e propriedades probióticas.

Para Batrinon e Labitte (2010) as BAL são os micro-organismos mais utilizados como probióticos. Devido a sua ocorrência em alimentos fermentados

juntamente com seu consumo ao longo da história, contribuiu para a sua aceitação como GRAS para consumo humano (SILVA *et al.*, 2002; LIU; HAN; ZHOU, 2011).

Algumas cepas de BAL podem apresentar propriedades funcionais e protetoras, o que as torna interessantes para a aplicação como culturas *starter* na produção controlada e otimizada de produtos vegetais fermentados (THAPA; TAMANG, 2004; TAMANG *et al.*, 2009). Portanto, sua presença em alimentos está correlacionada, além de sua função como *starter*, como probiótico e/ou bioconservante (DE VUYST, 2000; TURPIN *et al.*, 2010; ABRIOUEL *et al.*, 2012).

Nas matérias-primas vegetais, em geral, as BAL são uma pequena parte da microbiota autóctone (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). Algumas apresentam maior resistência a ambientes severos, como suco gástrico e bile, quando comparadas as de origem animal (HIGASHIKAWA *et al.*, 2010), devido ao contato com condições de ambientes extremamente ácidos, capacidade tamponante, alta concentração de nutrientes indigeríveis (fibras, inulina e fruto-oligossacarídeos) e fatores antinutricionais apresentados em algumas frutas e vegetais (VITALI *et al.*, 2012).

O isolamento e a caracterização de novas linhagens de BAL, de *habitats* não investigados podem ser vantajosos por revelar características taxonômicas, tecnológicas e funcionais interessantes. Portanto o objetivo do presente trabalho foi isolar, selecionar, avaliar algumas características fisiológicas e propriedades de interesse tecnológico como resistência aos sais de nitrito e cloreto de sódio, capacidade de acidificação e hidrólise da caseína, além de identificar as BAL provenientes de matérias-primas de origem vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Matérias-primas de origem vegetal, provenientes da região dos Campos Gerais (Paraná, Brasil) como o morango (*Fragaria* sp.), nêspera (*Eriobotrya japonica*), guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*), framboesa (*Rubus idaeus*), amora-preta (*Rubus fruticosus*), uva japonesa (*Hovenia dulcis*), café (*Coffea* sp.) *in natura* (cereja), erva mate (*Ilex paraguaiensis*) em folhas *in natura* e cancheadas, foram empregadas para o isolamento dos micro-organismos.

Cepas isoladas da água de côco (*Cocos nucifera*), do baru (*Dipteryx alata*) assim como o *Lactococcus lactis* INRA-18 foram obtidos do banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba, Brasil) e os cultivos isolados da maçã (*Malus domestica*) foram cedidos pelo Departamento de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR, Ponta Grossa, Brasil).

Todos os reagentes empregados eram para análise e/ou padrão molecular e os meios de cultivo eram de padrão microbiológico.

2.2 MÉTODOS

A sequência empregada, do isolamento dos cultivos até a etapa final de identificação molecular está apresentada na FIGURA 3.1.

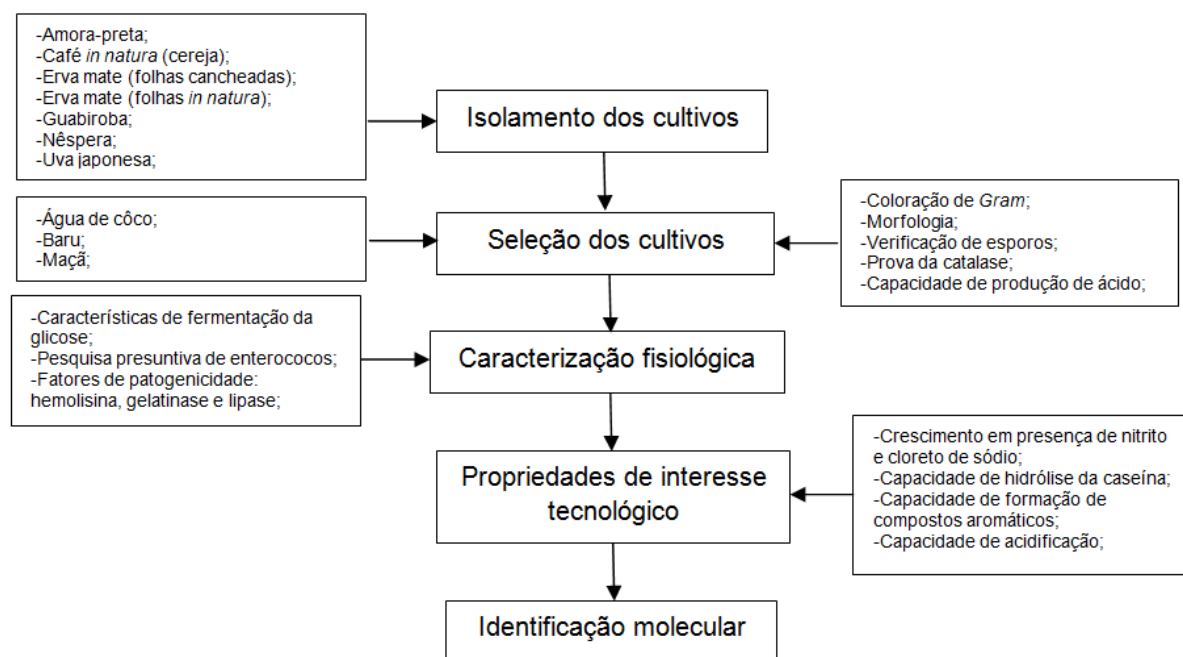


FIGURA 3.1 SEQUÊNCIA EMPREGADA, DO ISOLAMENTO DOS CULTIVOS ATÉ A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

2.2.1 Isolamento dos cultivos

A metodologia empregada foi adaptada do proposto por Prado (2007), o isolamento consistiu em submeter 25g de amostra das respectivas matérias-primas em 225mL de solução salina peptonada a 0,85% (p/v) de cloreto de sódio (Biotec, Pinhais, Brasil) e 0,1% (p/v) de peptona bacteriológica (Himedia, Mumbai, Índia) (SILVA; JUNQUEIRA, 1995) à homogeneização, utilizando sacos estéreis (Interscience, Ontario, Canadá), em triturador de tecidos e misturador *Stomacher* (Marconi, MA 440, Brasil) durante 2 min, seguido de incubação a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica (Quimis, 316B24, Brasil) por 48 horas.

O material incubado, diluído em água peptonada a 0,1% (p/v), foi inoculado em ágar *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) (Himedia) adicionado de 0,3% (v/v) de solução de azul de anilina a 4,0% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por semeadura em profundidade (*pour plate*) e incubado por 48 h a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ em anaerobiose. As colônias típicas e coradas de azul foram repicadas em caldo MRS (Himedia) e submetidas ao esgotamento descontínuo, até isolamento completo.

2.2.2 Recuperação das culturas

As culturas provenientes dos bancos de cepas foram inicialmente recuperadas por três etapas sucessivas de reativação na concentração de 1,0% (v/v) em caldo MRS a $37\pm 1^\circ\text{C}$ em estufa de DBO (Thelga, 34P, Brasil) por 16 h oras.

2.2.3 Manutenção das culturas

As estirpes isoladas foram conservadas em temperatura de -80°C em presença de 20,0% (v/v) de glicerol (Biotec) estéril.

As culturas obtidas foram mantidas em refrigeração ($4\pm 1^\circ\text{C}$), e para todas as avaliações, os cultivos foram antecipadamente reativados na concentração de 1,0% (v/v) em caldo MRS a $37\pm 1^\circ\text{C}$ em estufa de DBO por 16 horas.

2.2.4 Seleção dos cultivos

A seleção dos cultivos isolados foi realizada de acordo com os critérios de reação positiva para coloração de *Gram*, ausência de esporos, aspectos morfológicos, produção de catalase e capacidade de produção de ácido.

A coloração de *Gram* e a avaliação da presença de esporos foram realizadas de acordo com metodologia proposta por (SILVA *et al.*, 2010). A visualização das características morfológicas foi realizada em microscópio óptico binocular (Bel Photonics, BIO2B-AC-LED-B, Itália).

A prova da catalase foi realizada em ágar MRS inclinado e utilizando solução a 3,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (SILVA, 1996).

Para a capacidade de produção de ácido as culturas foram inoculadas por semeadura em superfície (*spread plate*) em ágar MRS suplementado com 0,004% (p/v) de púrpura de bromocresol (Vetec) e 0,5% (p/v) de carbonato de cálcio (Synth, Diadema, Brasil), sendo incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. A presença de ácido foi indicada pela viragem do indicador para coloração amarela ao redor das colônias (COSTA; VANETTI; PUSCHMANN, 2009).

2.2.5 Caracterização fisiológica dos cultivos selecionados

2.2.5.1 Característica de fermentação da glicose

Na avaliação do metabolismo fermentativo da glicose as culturas selecionadas foram inoculadas a 1,0% (v/v) em tubos contendo caldo MRS suplementado com 5,0% (p/v) de glicose (Merck), com tubos de *Durham* invertidos e adicionada uma camada de 1 cm de espessura de vaselina líquida (Synth) estéril. As culturas foram incubadas por 48 h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (POTES; MARINHO, 2007). A observação da presença ou ausência, de bolhas de gás no interior dos tubos de *Durham*, indicou um metabolismo heterofermentativo ou homofermentativo, respectivamente, para as estirpes avaliadas.

2.2.5.2 Pesquisa presuntiva de enterococos

O teste presuntivo para a pesquisa de enterococos foi realizado, nas culturas selecionadas, seguindo metodologia proposta por (SILVA; JUNQUEIRA, 1995). Os cultivos foram inoculados a 1,0% (v/v) em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia) suplementado com 6,5% (p/v) de cloreto de sódio, caldo BHI corrigido para pH 9,6 com solução 1N de hidróxido de sódio (Biotec) e ágar inclinado de bile esculina (New Prov, Pinhais, Brasil), incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 e 48 horas. A presença de crescimento do cultivo em teste, para todas as condições avaliadas, indica resposta positiva para o teste presuntivo de espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

2.2.5.3 Pesquisa de fatores de patogenicidade

Para avaliar as estirpes quanto ao aspecto de segurança foi realizada uma investigação de patogenicidade, observando a capacidade de produção das enzimas hemolisina, gelatinase e lipases.

Para a atividade de hemolisina as culturas foram estriadas em ágar BHI suplementado com 5,0% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (New Prov) e

incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (BAUMGARTNER *et al.*, 1998). A atividade hemolítica foi classificada como α -hemólise (hemólise parcial), β -hemólise (hemólise total) e γ -hemólise (ausência de hemólise), com formação halo esverdeado, halo claro e sem formação de halo ao redor das colônias, respectivamente. Esta classificação foi realizada pela observação dos halos característicos, conforme demonstra a FIGURA 3.2.



FIGURA 3.2 IMAGEM ILUSTRATIVA DOS HALOS CARACTERÍSTICOS DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA
FONTE: CHAVES (2009)

Na produção de gelatinase os cultivos foram inoculados em ágar nutriente (Himedia) suplementado com 3,0% (p/v) de gelatina (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), sendo incubados por 7 dias a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ e mantidas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos (SU *et al.*, 1991). A liquefação da gelatina, mesmo após a refrigeração, indica resultado positivo para a reação.

Para a avaliação de síntese de enzimas extracelulares lipolíticas, as cepas reativadas em ágar BHI a 37°C , foram semeadas no mesmo ágar suplementado com 0,2% (p/v) de cloreto de cálcio (Biotec), 1,0% (p/v) de Tween-80 (Merck) e 0,005% (p/v) de verde de bromocresol (Vetec) (ALBANO *et al.*, 2009). Uma reação positiva indica a formação de halo claro ao redor das colônias.

2.2.6 Propriedades de interesse tecnológico dos cultivos selecionados

Considerando que ao isolar cultivos de BAL poderiam ser encontradas espécies com variadas propriedades e aplicações tecnológicas, foi constatada a

importância de investigar algumas características de relevância para BAL a serem aplicadas na indústria de processamento de alimentos. Desta forma foram avaliados os parâmetros de capacidade de crescimento em presença de cloreto e nitrito de sódio, potencial de formação de compostos aromáticos, capacidade de acidificação em leite e proteólise da caseína para a indicação de possível aplicação em produtos alimentícios.

2.2.6.1 Crescimento em presença de cloreto e nitrito de sódio

A resistência dos cultivos frente ao cloreto de sódio foi avaliada em caldo MRS adicionado de 2,5, 4,0 e 6,0% (p/v) do sal e 0,004% (p/v) de púrpura de bromocresol como indicador. Após o tempo de incubação de 24 h a $37\pm1^{\circ}\text{C}$, foi observado o crescimento dos cultivos pela viragem do indicador para coloração amarela.

A capacidade de crescimento das culturas em presença de nitrito de sódio (Biotec), foi determinada em caldo MRS suplementado nas concentrações de 80, 100, 120 e 200 mg.L^{-1} do sal e 0,004% (p/v) de púrpura de bromocresol. O tempo de incubação foi de 24 h a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ e o crescimento foi observado pela viragem do indicador para coloração amarela.

2.2.6.2 Capacidade de acidificação

Para a capacidade de acidificação a cultura láctica foi inoculada, na concentração de 1,0% (v/v), em 50 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) (Sancor, Santa Fé, Argentina) a 10,0% (p/v) estéril ($121^{\circ}\text{C}/5\text{min}$) e cultivada a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Foi avaliada pela acidez total titulável e expressa em g.L^{-1} de ácido láctico (IAL, 2008) e pela determinação do pH em pHmetro digital (Tecnal, TEC-2mp, Brasil), sendo representada pela variação do pH durante o tempo de fermentação conforme a EQUAÇÃO 3.1 (SHRUTHY *et al.*, 2011) e velocidade de acidificação apresentado pela EQUAÇÃO 3.2 (DI CAGNO *et al.*, 2008). Foi realizado

um ensaio controle, sem adição de cultura láctica, a partir de LDR a 10% (p/v) estéril mantido a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

$$\Delta_{\text{pH}} = \text{pH} - \text{pH}_0 \quad (3.1)$$

Onde:

Δ_{pH} – variação do pH (adimensional);

pH – pH de um tempo qualquer de fermentação;

pH_0 – pH do tempo inicial;

$$V_{\text{acidificação}} = \frac{\Delta_{\text{pH}}}{\Delta t} = \frac{\text{pH} - \text{pH}_0}{t - t_0} \quad (3.2)$$

Onde:

$V_{\text{acidificação}}$ – velocidade de acidificação ($\text{dpH} \cdot \text{h}^{-1}$);

pH – pH de um tempo qualquer de fermentação;

pH_0 – pH do tempo inicial;

t – tempo qualquer (horas);

t_0 – tempo inicial (horas);

2.2.6.3 Capacidade de hidrólise da caseína

Para avaliar a atividade de hidrólise da caseína, foi utilizado o método colorimétrico de *Hüll* modificado (CARVALHO, 2007) que determina a quantidade de L-tirosina liberada no meio pela atividade enzimática decorrente do processo fermentativo das culturas lácticas.

Inicialmente as estirpes na concentração de 1,0% (v/v), foram adicionadas e fermentadas durante 24 h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ em LDR a 10,0% (p/v) pasteurizado a $63\pm 1^{\circ}\text{C}$ /30 minutos. Uma curva de calibração com L-tirosina (Synth) foi preparada, nas concentrações entre 0,2-2,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para o branco foi utilizado água destilada e o controle foi obtido a partir da solução a 10,0% de LDR pasteurizado.

2.2.7 Identificação molecular

2.2.7.1 Extração do DNA

O DNA cromossomal, dos cultivos que não foram caracterizados como enterococos e não apresentaram fator de patogenicidade, foi extraído pela adaptação do método *Modification of a Salting-Out Procedure* (MSOP) (MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2007). A partir de 5 mL da suspensão bacteriana foi obtida a biomassa por centrifugação (Fischer Scientific, micro 14, Inglaterra) a 7.200xg durante 5 min, sendo esta etapa de concentração de biomassa, repetida três vezes.

O sedimento foi ressuspendido em 500 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl (Amresco, Solon, Estados Unidos) e 1mM de EDTA (Amresco)) em pH 8,0 e centrifugado a 7.200xg por 5 min em temperatura ambiente. O precipitado obtido foi tratado com tampão TES (25 mM de Tris-HCl [pH 8,0], 10,0% (p/v) de sacarose (Merck), 10 mM de EDTA e 10 mg.mL⁻¹ de cloridrato de lisozima (Amresco)) e incubado a 37±1°C durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados os 600 µL do tampão (100 mM de Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM de EDTA, 10 mM de cloreto de sódio e 1,0% (v/v) de SDS (Amresco)), e o tubo invertido. Posteriormente, 10 µL de solução a 10 mg.mL⁻¹ de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) foram adicionados e incubados a 37±1°C por 15 min e 80±1°C por 5 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente por 10 min, foram adicionados 200 µL de solução 3M de acetato de sódio (Amresco) em pH 5,2, homogeneizados em agitador durante 15 s, e mantidos em gelo por 15 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 14.050xg por 15 minutos. O sobrenadante (~600µL) foi transferido para um novo microtubo, onde recebeu igual volume (1:1) de álcool isopropílico (Synth), homogeneizado em agitador e mantido a -20±1°C durante 60 minutos. Este volume foi centrifugado a 14.050xg por 5 min, o sobrenadante descartado, o precipitado lavado com 1mL de solução 70% (v/v) de álcool etílico (Synth), sendo centrifugado a 14.050xg por 5 min e, ao final, removido por inversão. O material extraído foi submetido à secagem em estufa bacteriológica a 37±1°C durante 1 hora. Ao final, o DNA foi solubilizado em 50µL de água ultrapura estéril.

Para confirmação da obtenção do DNA cromossomal, assim como os amplicons obtidos pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR) - *Reação em Cadeia da*

Polimerase foi utilizada eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia, Brasil) em gel a 1,5% (p/v) de agarose (Amresco), sendo utilizado marcador molecular de 1000 e 100 pb (EasyGen, São Paulo, Brasil), em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, por 60 minutos com 80 Volts. Posteriormente, o material foi visualizado, após tratamento com solução a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio (Amresco), em equipamento transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia, L-Pix). As imagens foram analisadas no software L-Pix *Image*, versão 1.21 (Loccus Biotecnologia).

2.2.7.2 Amplificação

O gene 16S rDNA dos micro-organismos selecionados foi amplificado pela reação de PCR utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen), para o domínio *Bacteria* (LANE *et al.*, 1985):

-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3');

-1492R (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3');

As reações de amplificação foram preparadas para o volume final de 20 μL , sendo utilizadas as proporções: 0,4 μL de dNTP's a 200mM (Invitrogen), 0,65 μL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 pmol. μL^{-1} , 2,0 μL de tampão 10x, 0,6 μL de cloreto de magnésio a 50 mM, 0,25 μL de Taq-DNA-polimerase *platinum* 1,5 unidades (Invitrogen), 2,0 μL de DNA molde diluído e 13,45 μL de água ultrapura estéril.

A amplificação foi realizada em termociclador (Axygen, Maxygene, Brasil) com a programação: 1 ciclo de $95\pm 1^\circ\text{C}/5$ min para desnaturação inicial, 25 ciclos de $94\pm 1^\circ\text{C}/1$ min (desnaturação), $62\pm 1^\circ\text{C}/10$ min (anelamento) e $72\pm 1^\circ\text{C}/10$ min (extensão) e 1 ciclo de $72\pm 1^\circ\text{C}/5$ min para a extensão final.

2.2.7.3 Sequenciamento

O sequenciamento do material genético foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil) utilizando o sequenciador automático (Genetic Analyzer, ABI-PRISM 3100) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde, na

concentração de 30 a 45 ng, foram marcados utilizando 3,2 pmol de oligonucleotídeos iniciadores, 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, Geneamp PCR System 9700) com uma etapa de desnaturação inicial a $96 \pm 1^\circ\text{C}/3$ min seguida de 25 ciclos de $96 \pm 1^\circ\text{C}/10\text{s}$, $55 \pm 1^\circ\text{C}/5\text{s}$ e $60 \pm 1^\circ\text{C}/4$ min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com solução a 75% (v/v) de isopropanol (Biotec) e lavagem com solução a 60% (v/v) de etanol (Biotec). Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µl de formamida (Biotec), desnaturados a $95 \pm 1^\circ\text{C}/5$ min, resfriados em banho de gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático.

Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando o programa *Data Collection* versão 1.0.1 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram submetidas aos aplicativos *Classifier* e *Seq Match*, pertencentes ao *Ribosomal Database Project* (RDP), que abriga um banco de sequências ribossomais e aplicativos de análise e alinhamento de sequências 16S rDNA de bactérias e arqueias.

2.2.8 Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos pela média das triplicatas e respectivos desvios padrão. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) usando o pós-teste de *Tukey*, com erro de $p < 0,05$, em programa SASM-Agri, versão 8.2 (CANTERI *et al.*, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERÍSTICAS DOS CULTIVOS ISOLADOS E SELECIONADOS

O número total de isolados, as características morfológicas observadas, assim como as cepas selecionadas de acordo com os critérios estabelecidos anteriormente (item 2.2.4), está representado na TABELA 3.1.

Foram empregadas matérias-primas, de 10 origens diferentes e características físico-químicas variadas, entre elas estão a guabiroba e a nêspera com somente 1 isolado para cada matéria-prima e a maçã com o maior número de isolados, 31 culturas. Porém foi observado para apenas 3 estirpes, reposta positiva para coloração de *Gram*, 2 para catalase negativa e 1 para produção de ácido, resultando em somente 1 estirpe selecionada. Foi verificada, em 23% e 83% das culturas isoladas de amora-preta e maçã, respectivamente, baixa resistência a sucessivas repicagens. A matéria-prima com maior número de cultivos selecionados foi o baru com 4 estirpes, provenientes de 5 isolados.

Desta forma, dos 63 cultivos investigados somente 13 se enquadraram nos critérios estabelecidos como seleção primária para BAL, ou seja, *Gram*-positiva, não formadora de esporos, forma de coco e/ou bacilos, catalase negativa e produtora de ácido. Avaliando o número total de isolados (63), 19% (12) não resistiram às sucessivas repicagens, 60% (39) foram classificados como outros grupos e somente 21% (13) foram selecionadas como BAL, valor considerado baixo quando comparado com 91% de seleção de BAL em fermentado de berinjela (SANCHÉZ, PALOP; BALLESTEROS, 2000).

A flora láctica é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias, porém apresentam características comuns como morfologia de bastonetes e cocos (GUEDES NETO *et al.*, 2005), *Gram*-positivas, catalase negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, adaptadas a ambientes ricos em nutrientes e capacidade de produzir ácido láctico como principal produto da fermentação de glicídios (POTES; MARINHO, 2007).

Di Cagno *et al.* (2011) verificaram que frutas e vegetais como amoras, ameixas, kiwi, mamão, funcho e cerejas apresentaram uma baixa população de BAL presuntivas, ou seja, uma biodiversidade limitada (*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* e *W.*

cibaria) também constatada para a microbiota de vegetais fermentados espontaneamente como azeitonas, pepino, tomates, abóbora, cenouras, pimentas, caqui, berinjela, entre outros.

TABELA 3.1 - NÚMERO TOTAL DE ISOLADOS E DE CEPAS SELECIONADAS COMO BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Matéria-prima de origem vegetal	Isolados (unidades)	Critérios de seleção (unidades)						Selecionados (unidades)	
		Gram positivo	Não esporulados	Morfologia			Catalase negativa		Produtor de ácido
				Cocos	Bacilos	Coco-bacilos			
Água de Côco (AC)	3	2	3	0	2	0	2	2	2
Amora-preta (AP)	6	1	6	2	0	4	1	1	1
Baru (B)	5	4	5	4	1	0	5	4	4
Café <i>in natura</i> (cereja) (CC)	4	1	4	0	3	1	1	1	1
Erva mate - folhas cancheadas (EM)	5	5	5	5	0	0	1	1	1
Erva mate - folhas <i>in natura</i> (FE)	5	4	5	5	0	0	1	1	1
Guabiroba (G)	1	1	1	1	0	0	1	1	1
Maçã (M)	31	3	14	10	10	4	2	1	1
Nêspira (N)	1	1	1	1	0	0	1	1	1
Uva japonesa (UJ)	2	1	2	1	1	0	2	0	0
Total = 63									Total = 13

3.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DOS CULTIVOS SELECIONADOS

As características fisiológicas avaliadas para as culturas selecionadas foram a capacidade de produção de gás carbônico como produto do metabolismo da glicose, a pesquisa presuntiva de enterococos e de patogenicidade, como apresenta a TABELA 3.2.

O metabolismo fermentativo da glicose para as culturas selecionadas apresentou resultado negativo para a produção de gás (dióxido de carbono), o que permitiu classificar os 13 cultivos em homofermentadores. As BAL podem utilizar duas vias para metabolizar carboidratos, na rota homofermentativa mais de 90% da fonte de carbono é convertida exclusivamente para ácido lático, pela via *Embden-Meyerhof-Parnas*. Já a via heterofermentativa resulta em quantidades equimolares de ácido lático, ácido acético, etanol e dióxido de carbono (SILVA, 2011).

TABELA 3.2 – CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS CULTURAS SELECIONADAS

Cultivo selecionado	Fermentação da glicose	Pesquisa presuntiva de enterococos			Pesquisa de patogenicidade				
		Crescimento em			Atividade hemolítica			Produção de gelatinase	Produção de lipases
		Metabolismo homofermentativo	NaCl a 6,5%	pH 9,6	Bile esculina	α	β	γ	
AC1	+	-	-	-	-	-	+	-	-
AC6	+	+	+	+	-	+	-	-	-
AP1	+	+	+	+	-	+	-	-	-
B14	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B16	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B17	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B22	+	+	+	+	-	+	-	-	-
CC1	+	+	+	+	-	+	-	-	-
EM1	+	+	+	+	-	+	-	-	-
FE1	+	+	+	+	-	+	-	-	-
G8	+	+	+	+	-	+	-	-	-
M60B	+	+	+	+	-	+	-	-	-
N1	+	+	+	+	-	+	-	-	-

NOTA: (+) Resposta positiva; (-) Resposta negativa

Avaliando a possibilidade das estirpes isoladas, pertencerem ao gênero *Enterococcus*, foi considerado relevante realizar testes presuntivos para a caracterização deste gênero. De acordo com os resultados obtidos, as cepas da água de côco (AC6), amora-preta (AP1), baru (B22), café cereja (CC1), erva mate cancheada (EM1), erva mate in natura (FE1), guabiroba (G8), maçã (M60B) e nêspera (N1) apresentaram resposta positiva para os três requisitos estabelecidos

pela literatura, para seleção presuntiva de enterococos. Desta forma, 9 cultivos selecionados como BAL, foram considerados pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

Somente as culturas provenientes do baru (B14, B16 e B17) e da água de côco (AC1) não apresentaram crescimento para as condições estabelecidas.

Ao contrário da maioria das BAL, o gênero *Enterococcus* não é considerado GRAS e as avaliações quanto à sua segurança ainda permanecem controversas (PERES *et al.*, 2012). Muitos genes de virulência e suas funções têm sido descritos em enterococos (CARLOS *et al.*, 2010). Em alguns países o uso do *Enterococcus* sp. como probiótico tem sido questionado devido à aspectos de segurança no que diz respeito a transferência de genes que conferem resistência a antibióticos (LUND; EDLUND, 2001; LJUNGH; WADSTRÖM, 2006).

Para a pesquisa dos fatores de patogenicidade avaliados, os cultivos B14, B16, B17 e AC1 determinados como não enterococos, apresentaram resultados negativos na produção de lipases e gelatinase.

Fatores de virulência como atividade hemolítica e gelatinase, são mecanismos comuns entre vários micro-organismos patogênicos (HUSAIN, 2008), assim como enzimas extracelulares lipolíticas (ALBANO *et al.*, 2009). A gelatinase é uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, onde essas proteinases encontram-se associadas com processos inflamatórios e virulências em humanos e animais (KANEMITSU *et al.*, 2001; CHAVES, 2009).

A produção de hemolisina ocorre devido ao requerimento de íons ferro, uma vez que este é um micronutriente requerido para o crescimento dos micro-organismos patogênicos, devido à sua participação como cofator de várias enzimas (HUSAIN, 2008). Foi observada resposta positiva para atividade γ -hemolítica, o que caracteriza ausência de produção de hemolisina para as culturas B14, B16, B17 e AC1 e não foi verificada a atividade α -hemolítica, decorrente da hemólise parcial das hemácias. Para o restante das estirpes, foi constatada atividade β -hemolítica, ou seja, houve produção de hemolisina em quantidade suficiente para promover a hemólise total das hemácias presentes no ágar sangue, como apresenta a FIGURA 3.3, representando uma resposta positiva para o fator de patogenicidade.



FIGURA 3.3 – ESTIRPE COM ATIVIDADE β -HEMOLÍTICA

Aspectos de segurança, como origem da estirpe, não apresentar histórico de associação com doenças e desordens intestinais, não carrear genes plasmidiais de resistência a antibióticos, não promover a degradação do muco intestinal, não translocar ou induzir a translocação de micro-organismos patogênicos para sítios extra-intestinais e ausência de fatores de patogenicidade, como a produção de hemolisina e gelatinase, devem ser avaliados (SAARELA *et al.* 2000; FAO/WHO, 2002).

Devido à ausência de dados conclusivos a respeito da segurança na utilização dos enterococos em alimentos, as linhagens testadas AC6, AP1, B22, CC1, EM1, FE1, G8, M60B e N1, que apresentaram resposta positiva no teste presuntivo para este gênero e alguma resposta positiva para o fator de patogenicidade, foram excluídos da pesquisa.

3.3 PROPRIEDADES DE INTERESSE TECNOLÓGICO DOS CULTIVOS SELECIONADOS

3.3.1 Resistência ao cloreto e nitrito de sódio

As culturas determinadas como não pertencentes ao gênero *Enterococcus* e não patogênicas foram pesquisadas quanto às propriedades relevantes para as BAL empregadas na industrialização de alimentos. A TABELA 3.3 demonstra os dados obtidos para as estirpes AC1, B14, B16 e B17 que apresentaram resposta positiva,

indicando a capacidade de crescimento, para todas as condições testadas dos sais cloreto e nitrito de sódio. Macedo *et al.* (2005) constataram resistência de cepas de *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei* e *Lb. casei* em concentração de 3,0% de cloreto de sódio e 200 mg.L⁻¹ de nitrito de sódio.

TABELA 3.3 - CAPACIDADE DE CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE CLORETO E NITRITO DE SÓDIO

Cultivo selecionado	Concentração de NaCl (%)			Concentração de NaNO ₂ (mg.L ⁻¹)				
	2,5	4,0	6,0	80	100	120	150	200
AC1	+	+	+	+	+	+	+	+
B14	+	+	+	+	+	+	+	+
B16	+	+	+	+	+	+	+	+
B17	+	+	+	+	+	+	+	+

NOTA: (+) Crescimento positivo;

Na formulação de produtos cárneos fermentados são empregadas, tradicionalmente, BAL denominadas de culturas *starter*. Essas culturas são utilizadas visando garantir a segurança microbiológica do produto, aumentar a estabilidade mediante a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis e melhorar as características sensoriais (LÜCKE, 2000; MACEDO *et al.*, 2005).

Para Erkkilä e Petäjä (2000) estas culturas lácticas devem estar adaptadas ao ambiente heterogêneo encontrado em produtos cárneos. Portanto, um dos principais fatores de avaliação para o emprego destas culturas no processamento de produtos cárneos é a tolerância ao cloreto de sódio e nitrato e/ou nitrito de sódio, conhecidos como agentes de cura. Os micro-organismos da cultura *starter* devem apresentar como características o crescimento vigoroso em concentrações de 6% de cloreto de sódio e de 100 mg.Kg⁻¹ de nitrito de sódio, crescimento na faixa de temperatura de 20 a 43°C e não possuir atividade patogênica ou produzir substâncias tóxicas (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

O cloreto de sódio é utilizado como agente flavorizante nas concentrações entre 2,5 a 3,0% e o nitrito de sódio é permitido como agente conservante com máximo de 150 mg.Kg⁻¹, segundo a Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que trata da “Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para categoria 8 – carne e produtos cárneos” (BRASIL, 1999).

A capacidade de crescimento, das cepas avaliadas, na presença de nitrito e cloreto de sódio permite considerar o possível emprego de produtos cárneos como matriz alimentar para veicular tais micro-organismos.

3.3.2 Capacidade de acidificação

Para a aplicação de BAL como culturas *starter*, na indústria de produtos lácteos, é importante avaliar o potencial de acidificação de cada linhagem isolada. A TABELA 3.4 apresenta a capacidade acidificante das culturas selecionadas, representada pela variação de pH durante o período de fermentação de 24 horas.

Comparando todas as linhagens avaliadas, após 5 h de fermentação, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para a variação do pH. Com 24 h de fermentação, as cepas B14 e B16 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) ao contrário das estirpes AC1 e B17. Ao avaliar a variação do pH durante a fermentação, as linhagens AC1 e B16 apresentaram variação significativa ($p < 0,05$) para todos os tempos e as cepas B14 e B17 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os tempos de 8 e 11h e 5 e 8h, respectivamente.

TABELA 3.4 – VARIAÇÃO DO pH OBTIDA DURANTE O PERÍODO DE FERMENTAÇÃO

Variação do tempo (horas)	ΔpH			
	AC1	B14	B16	B17
2	0,14 ^{eB} \pm 0,01	0,14 ^{dB} \pm 0,01	0,14 ^{eB} \pm 0,01	0,21 ^{dA} \pm 0,01
5	0,42 ^{dA} \pm 0,01	0,27 ^{cC} \pm 0,01	0,21 ^{dD} \pm 0,01	0,31 ^{cB} \pm 0,02
8	0,55 ^{cA} \pm 0,01	0,31 ^{bB} \pm 0,01	0,30 ^{cB} \pm 0,01	0,32 ^{cB} \pm 0,01
11	0,78 ^{bA} \pm 0,01	0,30 ^{bC} \pm 0,01	0,37 ^{bB} \pm 0,01	0,39 ^{bB} \pm 0,01
24	2,08 ^{aA} \pm 0,01	0,79 ^{aC} \pm 0,01	0,80 ^{aC} \pm 0,01	0,99 ^{aB} \pm 0,01

NOTA: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa $p < 0,05$ (Pós-teste de Tukey).

Shruthy *et al.* (2011) classificaram, quanto a atividade acidificante, as culturas lácticas como rápidas, médias e lentas quando obtida uma variação de 0,4 para o pH em 3h, 3-5h e mais que 5h, respectivamente. Desta forma, a cultura AC1 foi considerada de acidificação média com velocidade máxima de acidificação de 0,087 h⁻¹ em 24 h e as estirpes B14, B16 e B17 de acidificação lenta com velocidade máxima de acidificação de 0,072, 0,070 e 0,105 h⁻¹ em 2h, respectivamente. Desta forma a cultura AC1 possui maior capacidade de acidificação, porém com velocidade

menor quando comparada a cepa B17 que apresentou velocidade máxima em 2h de fermentação.

No desenvolvimento de culturas *starter* para o processamento de alimentos fermentados é importante a participação de espécies com uma capacidade de acidificação inicial de maior rapidez, pois ao diminuírem rapidamente o pH evitam o crescimento e/ou desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (SILVA, 2011).

O GRÁFICO 3.1 apresenta os resultados obtidos para a capacidade de acidificação representada pela acidez total durante o período de 24 h de fermentação. As culturas provenientes do baru (B14, B16 e B17), quando avaliadas entre si, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de ácido láctico, porém foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) da produção pela linhagem AC1. Durante a fermentação, as cepas B14 e B16 apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) no tempo de 24 h e a linhagem AC1 variou significativamente ($p < 0,05$) para todos os tempos avaliados.

A acidez total do ensaio controle ao final de 24h de fermentação foi de $2,30\text{g.L}^{-1}$, portanto, deve ser considerado que foram produzidas 2,20, 1,30, 1,10 e $1,30\text{g.L}^{-1}$ de ácido láctico pelas culturas AC1, B14, B16 e B17, respectivamente.

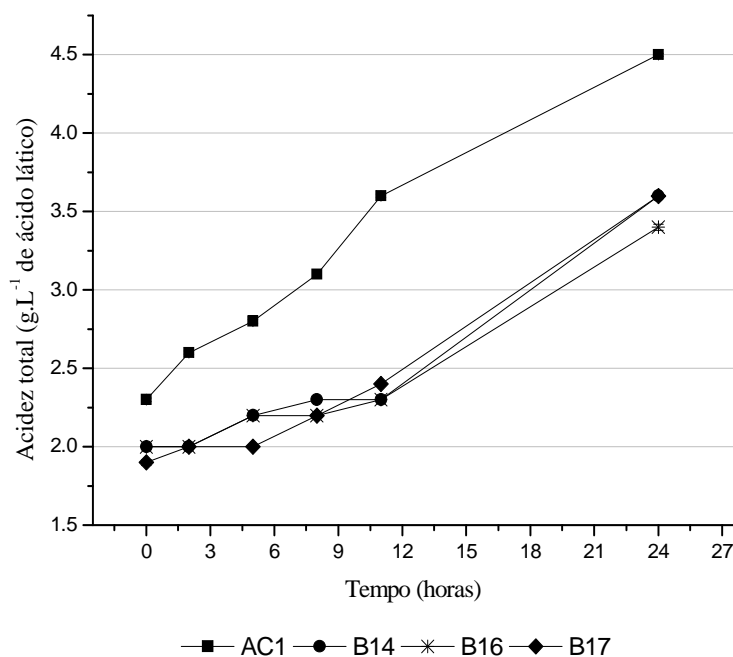


GRÁFICO 3.1 – CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO DAS CULTURAS SELECIONADAS, REPRESENTADA PELA ACIDEZ TOTAL

Para Carvalho (2007) a habilidade de produzir ácido pelos diferentes gêneros de BAL não é uma característica estável. Ela pode apresentar variações de acordo com diversos fatores, como gênero e espécie da cultura, ecossistema de origem do isolado, tratamento térmico do leite, temperatura e tempo de incubação, presença de antibióticos ou bacteriófagos.

Além da capacidade de acidificar o meio, as BAL devem ser ácido-tolerantes, pois devem sobreviver ao processo de fabricação de alimentos fermentados e em alguns casos se manter viáveis até o momento do consumo (SILVA, 2011).

3.3.3 Capacidade de hidrólise da caseína

A proteólise é um pré-requisito para o crescimento das BAL e a subsequente degradação das proteínas do leite (caseína), originando a liberação de peptídeos curtos e aminoácidos livres (SILVA, 2011).

Como pode ser observado no GRÁFICO 3.2, as estirpes AC1 e B14 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, porém diferiram das linhagens B16 e B17. A concentração de L-tirosina liberada, decorrente do tratamento térmico, foi determinada pelo ensaio controle como $43,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Portanto o valor real de L-tirosina proveniente da atividade das culturas AC1, B14, B16 e B17 foi de 66,0, 67,9, 195,7 e $99,4 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente.

Considerando que, quanto maior a concentração de L-tirosina, maior a capacidade proteolítica do micro-organismo, a estirpe B16 apresentou maior potencial de hidrólise da caseína.

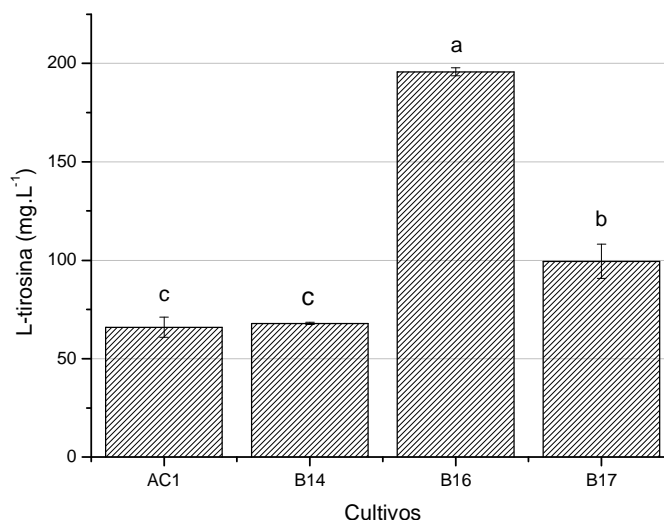


GRÁFICO 3.2 – TEOR DE L-TIROSINA LIBERADO DEVIDO À PROTEÓLISE DA CASEÍNA, PELAS CULTURAS, DURANTE A FERMENTAÇÃO

NOTA: Letras minúsculas diferentes entre os cultivos apresentam diferença significativa $p < 0,05$ (Pós-teste de Tukey)

Almeida, Bonassi e Roça (2001) avaliaram o teor de L-tirosina em bebida fermentada com 30% soro doce, e ao final de 28 dias de armazenamento refrigerado foram obtidas entre 50,0-70,0 mg.L⁻¹ para a cultura ABY-1 (*Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lb. acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) e 35,0-40,0 mg.L⁻¹ para o cultivo YC-180 (*Lb. bulgaricus* e *S. thermophilus*). Carvalho (2007) ao determinar a atividade proteolítica de isolados de queijo coalho obteve valores máximos 39,4, 17,6 e 80,0 mg.L⁻¹ para os gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, respectivamente.

Os componentes estruturais do sistema proteolítico podem ser divididos em três grupos, com base nas suas funções: a) as proteinases que quebram as proteínas em peptídeos; b) um sistema de transporte que conduz estes produtos através da membrana citoplasmática; c) peptidases que degradam peptídeos em aminoácidos livres, que serão degradados em uma via metabólica dependente, que irá produzir compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos produtos fermentados (MAYO *et al.*, 2010).

Assumindo que o mecanismo de proteólise está fundamentado, de forma simplificada, nos três itens citados anteriormente há o indicativo que o cultivo B16

possui maior eficiência em uma ou todas as fases da degradação proteica, em relação aos demais cultivos.

3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS CULTIVOS SELECIONADOS

Na identificação molecular das estirpes selecionadas, a FIGURA 3.4 (A) ilustra as bandas que identificam a presença do DNA cromossomal extraído das culturas AC1, B14, B16 e B17, acompanhadas pelo marcador molecular. A FIGURA 3.4 (B), apresenta as bandas referentes aos produtos amplificados por PCR, assim como o marcador molecular utilizado de 100 pb.

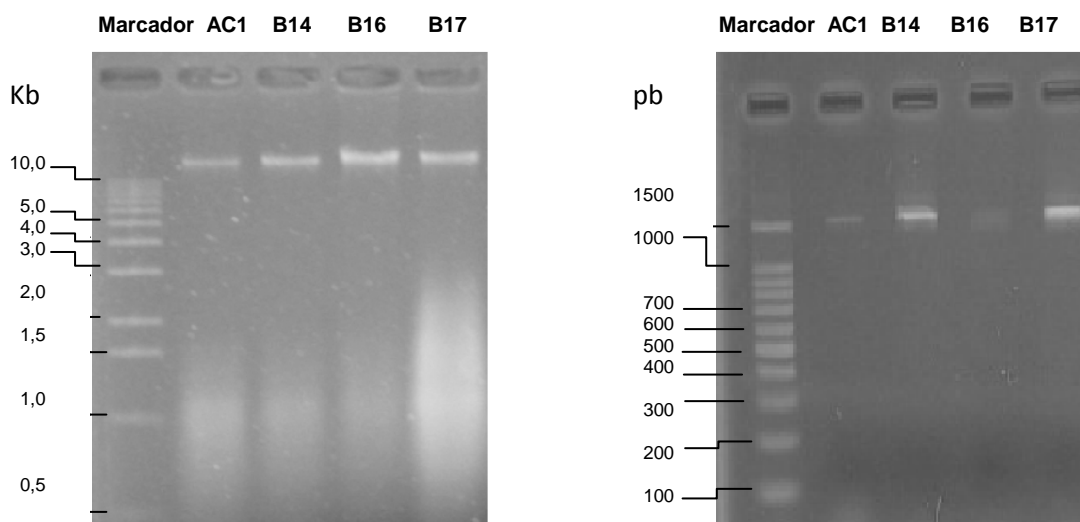


FIGURA 3.4 –(A) BANDAS QUE IDENTIFICAM A PRESENÇA DO DNA CROMOSSOMAL EXTRAÍDO DAS CULTURAS AC1, B14, B16 e B17 E O MARCADOR MOLECULAR; (B) BANDAS QUE IDENTIFICAM OS PRODUTOS AMPLIFICADOS DA PCR DOS ISOLADOS AC1, B14, B16 e B17 E O MARCADOR MOLECULAR

O método denominado MSOP, utilizado para extração do DNA das linhagens investigadas, tem por base um procedimento adaptado de *salting-out* e foi validado para mais de 500 linhagens de BAL de diferentes gêneros (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) além de outras espécies Gram-positivas (*Micrococcus*, *Kocuria* e *Corynebacterium*). A qualidade das bandas obtidas pela eletroforese, do material cromossômico das linhagens avaliadas, permite considerar que esta metodologia também apresentou resultados favoráveis para a identificação de micro-organismos do gênero *Pediococcus*.

A obtenção de DNA genômico a partir de micro-organismos *Gram*-positivos, e particularmente de BAL pode apresentar dificuldades em função da compactação e composição da parede celular destes organismos (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005). A resistência mecânica desta estrutura é superior àquela observada nas bactérias *Gram*-negativas, e isso exige maiores esforços e métodos mais robustos para promover a lise celular (BORDIGNON JÚNIOR, 2011).

A TABELA 3.5 demonstra a classificação filogenética obtida pela identificação molecular das estirpes AC1, B14, B16, B17 que foram submetidas à comparação com um banco de sequências ribossomais, tendo confirmação de 96,3, 82,4 e 93,0% para *P. acidilactici* nos cultivos B14, B16 e B17 respectivamente.

Para a linhagem AC1 os resultados, desta pesquisa, indicaram uma cepa do gênero *Lactobacillus*, porém não foram conclusivos quanto à espécie. PRADO (2007) ao pesquisar a cultura AC1, obteve por métodos bioquímicos, a caracterização desta linhagem como *Lb. plantarum*. Entretanto, ao empregar técnicas de identificação molecular, verificou apenas 62,7% de similaridade para os perfis de *Lb. sakei* e *Lb. rhamnosus*.

TABELA 3.5 – CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA OBTIDA PELA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Classificação	Linhagens			
	AC1	B14	B16	B17
Domínio	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Classe	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Ordem	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales
Família	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae
Gênero	<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
Espécie	-	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Índice de confirmação*	-	96,3	82,4	93,0

NOTA: * Valor percentual da sequência analisada em relação ao banco de sequências ribossomais (RDP), sendo que a espécie mais próxima corresponde ao melhor pareamento.

Bordignon Júnior (2011) utilizando a metodologia do MSOP[®] e o mesmo par de iniciadores (27F e 1492R) obteve como índice de confirmação 98,9% como *Lb. plantarum* Chikuso-1 para isolado de fezes de frango caipira, 90,0% como *Lb. plantarum* AB104855 para cepa proveniente de fezes de papagaio e 98% como *P. acidilactici* BFE 8245 isolado de frutos de côco.

Considerando o maior percentual de confirmação (96,3%) como *P. acidilactici* entre as linhagens avaliadas, para a etapa seguinte da pesquisa referente à caracterização do potencial probiótico foi utilizada a cultura codificada como B14.

4 CONCLUSÕES

Foram utilizados materiais vegetais distintos para o isolamento, sendo obtidas ao todo 63 linhagens e somente 13 selecionadas como BAL. Destas culturas selecionadas como BAL, 9 foram classificadas como enterococos e com atividade β -hemolítica.

As 4 linhagens restantes (AC1, B14, B16 e B17) apresentaram propriedades de interesse tecnológico tecnológicas como capacidade de crescimento em presença de 2,5, 4,0 e 6,0% de cloreto de sódio e 80, 100, 120 e 200 mg.L⁻¹ de nitrito de sódio, capacidade lenta e média de acidificação após 24 de fermentação e teor de L-tirosina liberada variando de 66,0 a 195,7 mg.L⁻¹.

O resultado obtido pela identificação molecular apresentou o índice de confirmação mais elevado, de 96,3%, como *Pediococcus acidilactici* para a linhagem B14.

As propriedades de interesse tecnológico, avaliadas, assim como a identificação molecular obtida, permitem indicar a associação destes cultivos na obtenção de culturas *starter* a serem utilizados na fermentação alimentos variados e como culturas proteolíticas em alimentos maturados como queijos.

REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; COBO, A.; CABALLERO, N.; FUENTES, M.A.F.; PÉREZ-PULIDO, R.; GÁLVEZ, A. Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented manzanilla Aloreña green table olives. **Food Microbiology**, v. 32, p.308-316, 2012.
- ALBANO, H.; PINHO, C.; LEITE, D.; BARBOSA, J.; SILVA, J.; CARNEIRO, L.; MAGALHÃES, R.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. **Food Control**, v.20, p.764-770, 2009.
- ALMEIDA, K.E. de; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p.187-192, 2001.
- BATRINON, A.; LABITTE, T. The use of lactic acid bacteria in probiotic products, p.17-27, 2010.
- BAUMGARTNER A.; KUEFFER, M.; SIMMEN, A.; GRAND, M. Relatedness of *L. rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, p.489-494, 1998.
- BORDIGNON JÚNIOR, S.E. Seleção de biocompostos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº1.004, de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para categoria 8 – carne e produtos cárneos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 mar. de 1999.
- CABEEN, M.T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.601-610, 2005.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos *Scoft-Knott*, *Tukey* e *Duncan*. **Revista Brasileira de Agrocumpatação**, v.1, p.18-24, 2001.
- CARVALHO, J.D.G. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 143 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- CARLOS, A.R.; SEMEDO-LEMSADDEK, T.; BARRETO-CRESPO, M.T.; TENREIRO, R. Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.1563-1575, 2010.
- CHAVES, K. da S. Avaliação de características probióticas e de segurança de *Lactobacillus spp.* isolados a partir de recém-nascidos. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

COSTA, W.A.; VANETTI, M.C.D.; PUSCHMANN, R. Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.4, p.785-792, 2009.

DE VUYST, L. Technology aspects related to the application of functional starter culture. **Food Technology and Biotechnology**, v.38, p.105-112, 2000.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C.G.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Effect of lactic fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiology**, v.28, p.1062-1071, 2011.

DI CAGNO, R.; SURICO, R.F.; SIRAGUSA, S.; DE ANGELIS, M.; PARADISO, A.; MINERVINI, F.; DE GARA, L.; GOBBETTI, M. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic fermentation of carrots, French beans or marrows. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.220-228, 2008.

ERKKILA, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter culture at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v.55, p.297-300, 2000.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada, 2002.

FOLIGNÉ, B.; DEWULF, J.; BRETON, J.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; PROT, B. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, p.136-145, 2010.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.245-250, 2005.

HIGASHIKAWA, F.; NODA, M.; AWAYA, T.; NOMURA, K.; OKU, H.; SUGIYAMA, M. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. **Nutrition**, v. 26, p.367-374, 2010.

HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, v.57, p.331-334, 2008.

HUTKINS, R.W. **Microbiology and technology of fermented foods**. 1.ed. Ames: Blackwell, 2006.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico químicos para análise de alimentos**. 4.ed. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KANEMITSU, K.; NISHINO, T.; KUNISHIMA, H.; OKAMURA, N.; TAKEMURA, H.; YAMAMOTO, H.; KAKU, M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, p.11-16, 2001.

LANE, D.J.; PAGE, B.; OLSEN, G.J.; STHAL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p.6955-6959, 1985.

LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v.7, p.73-90, 2006.

LUND, B.; EDLUND, C. Probiotic *Enterococcus faecium* strains is a possible recipient of the vanA gene cluster. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p.1384-1385, 2001.

LIU, S. N.; HAN, Y.; ZHOU, Z. J. Lactic acid bacteria in traditional fermented chinese foods. **Food Research International**, v.44, p.643-651, 2011.

LÓPEZ-DIAS, T.M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCIA-LÓPEZ, M.L.; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a ham-made blue cheese. **Food Microbiology**, v.17, p.23-32, 2000.

LÜCKE F.K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, p.105-115, 2000.

MACEDO, R.E.F.; PLANZER JÚNIOR, S.B.; TERRA, N.N.; FREITAS, R.J.S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **Boletim do CEPPA**, v.23, p.123-134, 2005.

MARTÍN-PLATERO, A.M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. **Analytical Biochemistry**, v.366, p.102-104, 2007.

MAYO, B.; ALEKSANDRAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; KWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. **Biotechnology of lactic acid bacteria: updates in the metabolism of lactic acid bacteria**. s/l:Blackwell Publishing, p.3-33, 2010.

PERES, C.M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria: with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v.36, p.31-42, 2012.

PINTO, M.F.; PONSANO, E.H.G.; HEINEMANN, R.J.B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos: uma revisão. **Boletim do SBCTA**, v.35, p.109-116, 2001.

POTES, M.E.; MARINHO, A.A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.145-152, 2007.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de bebida probiótica à base de água de côco**. 163 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J.A.; LANDETE, J.M.; RIVAS, B. de; FELIPE, F.; L. de; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J.M.; MUÑOZ, R. Foods phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.79-90, 2009.

SAARELA, M.; MONGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.83, p.197-215, 2000.

SANCHEZ I.; PALOP, L.; BALLESTEROS, C. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.9-17, 2000.

SHRUTHY, V.V.; PAVITHRA, M.; GOWRI, S.; GHOSH, A.R. Probiotic potentials among lactic acid bacteria isolated from curd. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v.2, p.602-609, 2011.

SILVA, J.; CARVALHO A.S.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P.A. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.77-81, 2002.

SILVA, L. de J. M. da. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge DOP**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

SILVA, N. da. **Testes bioquímicos para identificação de bactérias em alimentos: informes técnicos nº1**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. 87p.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.J. **Métodos de análise microbiológica de alimentos: manual técnico nº14**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. p.17-19.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2010.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p.1-29, 1997.

SU, Y.A.; SULAVIK, M.C.; HE, P.; MAKINEN, K.K.; MAKINEN, P.L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R.; CLEWELL, D.B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v.59, p.415-420, 1991.

TAMANG, J.P.; TAMANG, B.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p.28-33, 2009.

THAPA, S.; TAMANG, J.P. Product characterization of kodo ko jaanr fermented finger millet beverage of the Himalayas. **Food Microbiology**, v.21, p. 617-622, 2004.

TURPIN, W.; HUMBLLOT, C.; TOMAS, M.; GUYOT, J.P. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. **International Journal Food Microbiology**, v. 143, p.87-102, 2010.

VASILEJIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics: from Metchnikof to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714-728, 2008.

VITALI, B.; MINERVINI G.; RIZZELLO, C.G.; SPISNI, E.; MACCAFERR, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v.31, p.116-125, 2012.

CAPÍTULO IV – CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DA CEPA *Pediococcus acidilactici* B14 E DESENVOLVIMENTO DE CULTURA ASSOCIADA COM *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial probiótico da cepa *Pediococcus acidilactici* B14, isolada do fruto do baru (*Dipteryx alata*) proveniente do cerrado brasileiro, assim como seu potencial de associação com a cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. A linhagem B14 foi avaliada quanto à capacidade de produção dos isômeros de ácido láctico, por método enzimático, quanto a sua resistência as condições de pH ácido e sais biliares, tolerância à antibióticos e micro-organismos patogênicos, capacidade de resistência ao sistema gastrointestinal, simulado *in vitro*, e da adesão em células de adenocarcinoma de cólon humano. O potencial de associação desta cepa foi verificado frente a três estirpes, *Lactobacillus paracasei* E-2, *Lactobacillus casei rhamnosus* H-19 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. A cultura associada foi avaliada quanto à capacidade de crescimento e produção de ácido láctico em meio padronizado, a evolução da acidez total, expressa em ácido láctico, em extrato aquoso de soja como meio de fermentação, assim como a resistência ao sistema gastrointestinal. A cepa produziu ácido láctico na forma racêmica na proporção L:D de 1,4:1, apresentou um índice de sobrevivência de 44,49% em pH 2,5 e 70,8% em 0,3% de sais biliares no tempo de 180 minutos. A tolerância aos antimicrobianos vancomicina, cefotaxima, penicilina G, cefalexina e neomicina também foi verificada, quanto ao antagonismo à patógenos, inibiu as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Salmonella sp.* A simulação da passagem pelo sistema gastrointestinal resultou em 65,82% e 97,45% de sobrevivência nos pHs de 2,0 e 4,0 de suco gástrico, respectivamente. Quanto à capacidade de adesão, foi obtida a aderência de 64 bactérias/100 células HRT-18 de adenocarcinoma humano. O desenvolvimento da cultura associada com *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, resultou em uma taxa máxima de crescimento de $0,513\text{ h}^{-1}$ atingida em 10 horas de fermentação, produtividade em ácido láctico de $0,42\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, acidez total de $0,772\text{ g.L}^{-1}$ em extrato aquoso de soja suplementado com glicose e índice de sobrevivência, após a passagem pelo trato gastrointestinal, de 57,28 e 92,39%. Com os resultados obtidos, a estirpe de *Pediococcus acidilactici* B14 pode ser considerada potencialmente probiótica, e quando associada apresentou características promissoras para ser veiculada em uma matriz alimentar.

Palavras-chave: *Pediococcus acidilactici*. Probiótico. Sistema gastrointestinal. Cultura associada. *Lactobacillus acidophilus*

1 INTRODUÇÃO

O perfil probiótico de uma cepa pode ser traçado utilizando inúmeras características, porém Havenaar, Ten Brink e Huis in't Veld (1992) propuseram os parâmetros de total segurança para o hospedeiro, resistência a acidez gástrica e secreções pancreáticas, adesão às células do epitélio intestinal, atividade antimicrobiana, inibição da adesão de bactérias patogênicas, resistência a antibióticos, tolerância aos aditivos alimentícios e estabilidade na matriz alimentar (SOCCOL *et al.*, 2010). É importante enfatizar que os efeitos na promoção à saúde são cepa-dependente e não podem ser preditos por uma determinada espécie de micro-organismo, e que não há uma única cepa probiótica capaz de fornecer todos os benefícios amplamente conhecidos (SHAH, 2007; CRUZ *et al.*, 2009).

Atualmente, as bactérias usadas como probióticos são quase exclusivamente isoladas de fonte humana ou animal, como *Bifidobacterium* (*B.*), *Lactobacillus* (*Lb.*) ou mesmo *Enterococcus* (*E.*) (OGIER; SERROR, 2008; PERES *et al.*, 2012). A maioria dos estudos sobre as propriedades fisiológicas de cepas que podem ser empregadas como probióticas, tratam de micro-organismos originários de cavidades internas, humana ou animal considerando que devido à origem, estas bactérias possam colonizar melhor o trato gastrointestinal (TGI) humano/animal (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2012). Para Papagianni e Anastasiadou (2009) os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* (*P.*), *Leuconostoc* (*L.*) e *Lactococcus* (*Lac.*) fazem parte da flora intestinal de humanos e animais, e as espécies do gênero *Pediococcus* comumente isoladas da flora intestinal humana são *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*.

Para Vitali *et al.* (2012) o contato com condições de elevada acidez, alta concentração de nutrientes indigeríveis (fibras, inulina e fruto-oligossacarídeos) e como compostos fenólicos, presentes em vegetais podem influenciar a resistência em ambientes severos como do TGI. Portanto, as frutas e alguns vegetais *in natura* possuem parâmetros químicos e físicos intrínsecos que, para algumas características, imitam o TGI humano (ROSSI *et al.*, 2005). Desta forma, matrizes vegetais podem constituir como fonte alternativa de isolamento de micro-organismos com potencial probiótico (PERES *et al.*, 2012).

As bactérias ácido lácticas (BAL) derivadas de plantas geralmente apresentam resistência à acidez e sobrevivem no trato digestório, oferecendo, por vezes, ainda propriedades imunomodulatórias, de aderência e/ou antimicrobiana que rendem oportunidades probióticas (FOLIGNÉ *et al.*, 2010).

Os pediococos são empregados como micro-organismos benéficos no contexto da microbiologia de alimentos e da pecuária (HAAKENSEN; VICKERS; ZIOLA, 2009), podendo ser usados como culturas *starter* ou como probióticos (KLARE *et al.*, 2007). Para Papagianni e Anastasiadou (2009) ainda são micro-organismos pouco estudados, entretanto o interesse parece aumentar tanto na comunidade científica, quanto na indústria. Nos últimos anos muitos artigos importantes têm sido publicados, assim como suplementos contendo *Pediococcus* spp. tem entrado no mercado de nutracêuticos.

A cepa de *P. acidilactici* possui propriedades interessantes como resistência ao calor, frio, pH e tratamentos proteolíticos, capacidade de produção de peptídeo antimicrobiano (pediocina) com atividade anti-listerial e com espectro antimicrobiano, o que a torna interessante como biopreservativo de alimentos (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009). Lee *et al.* (2007) relataram a eficácia de uma linhagem de *P. acidilactici* adicionada em ração animal no tratamento de coccidiose em frangos de corte. Takata *et al.* (2010) relataram a importância da cepa *P. acidilactici* R037 em induzir a interleucina 10 (IL-10) a produzir células T reguladoras, suprimindo a encefalomielite auto-imune (modelos animais), mecanismo relacionado com a esclerose múltipla.

O *Lb. acidophilus* é considerado a espécie predominante, dos lactobacilos, no trato intestinal de humanos saudáveis. Considerado de interesse industrial por ser utilizado como cultura *starter* em produtos lácteos fermentados e na produção de compostos com função antimicrobiana. Apresenta também importância médica por estar associado na redução dos níveis de bactérias patogênicas e leveduras no intestino delgado (AHMED *et al.*, 2010). A linhagem *Lb. acidophilus* ATCC 4356 tem apresentado resultados que indicam o seu potencial probiótico, como a atuação no metabolismo do colesterol (HUANG; ZHENG 2010), atividade antagonista frente ao patógeno *Campylobacter jejuni* (CAMPANA *et al.*, 2012), entre outros.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a cepa *P. acidilactici*, linhagem B14, quanto às potencialidades como micro-organismo probiótico e desenvolver uma cultura associada com a cultura láctica *Lb. acidophilus* ATCC 4356.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

As cepas de *P. acidilactici* B14, *Lb. acidophilus* ATCC 4356, *Lb. casei rhamnosus* H-19 e *Lb. paracasei* E-2, utilizadas na pesquisa foram obtidas do banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba, Brasil). Sendo a estirpe de *P. acidilactici* B14 isolada do baru (*Dipteryx alata*), fruto do cerrado brasileiro e a cepa de *Lb. acidophilus* ATCC 4356, de origem humana.

As cepas patogênicas utilizadas de *Salmonella* sp., *Bacillus* (*B.*) *cereus* ATCC 33018 e *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* ATCC 6538P foram obtidas do banco de cepas do Departamento de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR, Ponta Grossa, Brasil) e a *Escherichia* (*E.*) *coli* ATCC 25922 do banco de cepas do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG, Ponta Grossa, Brasil).

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, HRT-18 (ATCC CCL-244), foi obtida do banco de células Departamento de Biologia Genética da UEPG.

Todos os reagentes empregados eram para análise e/ou padrão molecular e os meios de cultivo eram de padrão microbiológico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Manutenção das culturas

As culturas empregadas na pesquisa foram mantidas em refrigeração ($4\pm1^{\circ}\text{C}$) durante todo o tempo do estudo, e para todas as avaliações, foram antecipadamente reativadas na concentração de 1,0% (v/v) em caldo *Man, Rogosa* e *Sharpe* (MRS) (Himedia, Mumbai, Índia) a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 16 horas.

As estirpes patogênicas foram reativadas na concentração de 1,0% (v/v) em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia) a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 16 horas.

As culturas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356, quando utilizadas na forma associada, foram cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:1, no momento do uso.

2.2.2 Método microbiológico para contagem celular

O método microbiológico empregado para determinação da viabilidade celular foi o *drop plate* (SILVA *et al.*, 2010). Consiste na deposição em quadrantes, dispostos em triplicata, de gotas de 10 µL da diluição de interesse na superfície seca do ágar. A população celular foi estabelecida de acordo com a EQUAÇÃO 4.1.

$$PC = \frac{NC \times 100}{D} \quad (4.1)$$

Onde:

PC – população celular (UFC.g⁻¹ ou UFC.mL⁻¹);

NC – número de colônias contadas;

D – diluição em que foi realizada a contagem das colônias;

2.2.3 Avaliação das propriedades probióticas do *P. acidilactici* B14

As propriedades quanto ao perfil probiótico da cepa *P. acidilactici* B14, foram determinadas considerando alguns dos critérios estabelecidos pelas “Diretrizes para avaliação de probióticos em alimentos” estabelecidos pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) em 2002. Portanto, foram investigadas a quantificação do ácido láctico produzido, avaliação da tolerância ao pH ácido, sais biliares, antimicrobianos e patógenos. Assim como, a resistência ao sistema gastrointestinal (SGI) e capacidade de adesão em células do epitélio intestinal, por simulação *in vitro*.

2.2.3.1 Determinação da concentração do ácido láctico

A configuração e a quantificação dos isômeros do ácido láctico a partir da glicose foram determinadas enzimaticamente em sobrenadante livre de células da

cepa de *P. acidilactici* B14 em caldo MRS cultivado por 24h a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ em sistema estático.

A dosagem foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu, mini 1240, Japão) a 340 nm, foram utilizadas as enzimas D-lactato desidrogenase (D-LDH), L-lactato desidrogenase (L-LDH) e Glutamato-Piruvato-Transaminase (GPT) do kit *Enzyplus* (Diffchamb, Vastra Frolunda, Suécia). A quantificação dos isômeros L-lactato e D-Lactato foi obtida pela EQUAÇÃO 4.2.

$$C_{AL} = \frac{(V \times PM \times \Delta DO)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} \times D \quad (4.2)$$

Onde:

C_{AL} – concentração de ácido láctico (g.L^{-1});

V- volume total do ensaio (2,24 mL);

PM – peso molecular do ácido láctico ($90,1 \text{ g.mol}^{-1}$);

ΔDO – variação da densidade óptica entre amostra e branco (água) ($\Delta DO = DO_a - DO_b$);

ϵ -coeficiente de extinção do NADH ($6,3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$);

d- trajetória óptica (1 cm);

v – volume da amostra (0,1 mL);

D – diluição (quando necessário);

2.2.3.2 Avaliação da resistência ao pH ácido e sais biliares

O comportamento da bactéria frente o pH ácido, e a presença dos sais biliares foi avaliado de acordo com Urnau *et al.* (2012). A resistência à variação do pH foi determinada durante 180 e 360 min a $37\pm1^{\circ}\text{C}$, no caldo MRS em pH 1,3, 2,5 e 4,0, corrigido com ácido clorídrico concentrado (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A tolerância aos sais biliares foi determinada por 180 e 360 min a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ em caldo MRS suplementado com 0,3% e 1,0% (p/v) de sais biliares de origem bovina (Deg, São Paulo, Brasil).

2.2.3.3 Avaliação da resistência aos antibióticos

A resistência da bactéria frente a antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão (NCCLS, 2003), sendo aplicados 500 µL da cepa reativada sobre ágar MRS em placa. Antibióticos de diferentes grupos de mecanismos de ação foram empregados: inibidores de parede celular como β-lactâmicos do grupo das penicilinas: amoxicilina (10µg.disco⁻¹) e penicilina G (10µg.disco⁻¹); β-lactâmicos cefalosporínicos: cefalexina (30µg.disco⁻¹) e cefotaxima (30µg.disco⁻¹); β-lactâmicos carbapenêmicos: imipenem (10µg.disco⁻¹); glicopeptídeos: vancomicina (30µg.disco⁻¹) e os inibidores de síntese protéica como tetraciclina (30µg.disco⁻¹); aminoglicosídeos: neomicina (30µg.disco⁻¹); fenólicos: cloranfenicol (30µg.disco⁻¹); lincosamidas: clindamicina (02µg.disco⁻¹) e macrolídeos: eritromicina (15µg.disco⁻¹) (New Prov, Pinhais, Brasil). Os resultados foram expressos considerando o diâmetro (mm) dos halos de inibição ao redor dos discos.

2.2.3.4 Determinação da resistência frente à patógenos

Para avaliar o comportamento da cepa frente à patógenos foi adaptado o método *spot-on-the-lawn* (MARTINS *et al.*, 2006). A cultura *P. acidilactici* B14 foi denominada de produtora, ou seja, aquela testada quanto à capacidade antagonista, e como culturas reveladoras as espécies patogênicas, *Salmonella sp.*, *B. cereus* ATCC 33018, *S. aureus* ATCC 6538P e *E. coli* ATCC 25922. Sobre o ágar MRS foram depositadas, gotas de 5µL do caldo fermentado, por 16 h, com a cepa produtora, sendo as placas incubadas por 48 h a 37±1°C. Na sequência foram vertidos sobre a placa 10mL de caldo BHI com 1,0% (p/v) de ágar bacteriológico (Himedia) e 10,0% (v/v) de caldo BHI com a cepa reveladora a 10,0% (v/v). A placa foi mantida por 12 h a 4±1°C e em seguida incubada a 37±1°C por 48 horas. Para verificar o antagonismo na ausência de ácidos orgânicos, o ágar MRS foi tamponado com 0,2% (p/v) de bicarbonato de sódio (CRQ, Diadema, Brasil). Os resultados foram expressos considerando o diâmetro (mm) do halo de inibição ao redor das gotas da cepa produtora.

2.2.3.5 Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal

A simulação, *in vitro*, da resistência da bactéria ao SGI foi adaptada de Fernández, Boris e Barbés (2003) e teve como objetivo avaliar a viabilidade celular da cultura de *P. acidilactici* B14 após ser submetida às condições gastrointestinais simuladas.

O suco gástrico (SG) foi composto por cloreto de sódio (Biotec, Pinhais, Brasil) a 125 mM, cloreto de potássio (Biotec) a 7 mM, bicarbonato de sódio (Biotec) a 45 mM, 0,3% (p/v) de pepsina porcina (Nuclear, Diadema, Brasil). Utilizado em pH 2,0 e 4,0, sendo corrigido com ácido clorídrico concentrado e esterilizado em filtro de 0,45 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech, Bohemia, Estados Unidos). O suco intestinal (SI) foi formulado com 0,5% (p/v) de cloreto de sódio, 0,1% (p/v) de pancreatina porcina (350 FIP-U/g de protease; 6000 FIP-U/g de lipase; 7500 FIP-U/g de amilase – Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,15% (p/v) de bile bovina em pH 8,0, corrigido com solução a 5M de hidróxido de sódio. Este foi posteriormente esterilizado em microfiltro de 0,45 µm de poro. A resistência da cultura foi avaliada nas condições de pH 2,0 e 4,0 para o SG, nos intervalos de 90 min (T_1) e 180 min (T_2). Os tempos de 270 min (T_3) e 360 min (T_4) foram empregados no experimento com a presença de SI. A FIGURA 4.1 apresenta as etapas da avaliação *in vitro* da resistência da cultura bacteriana ao SGI.

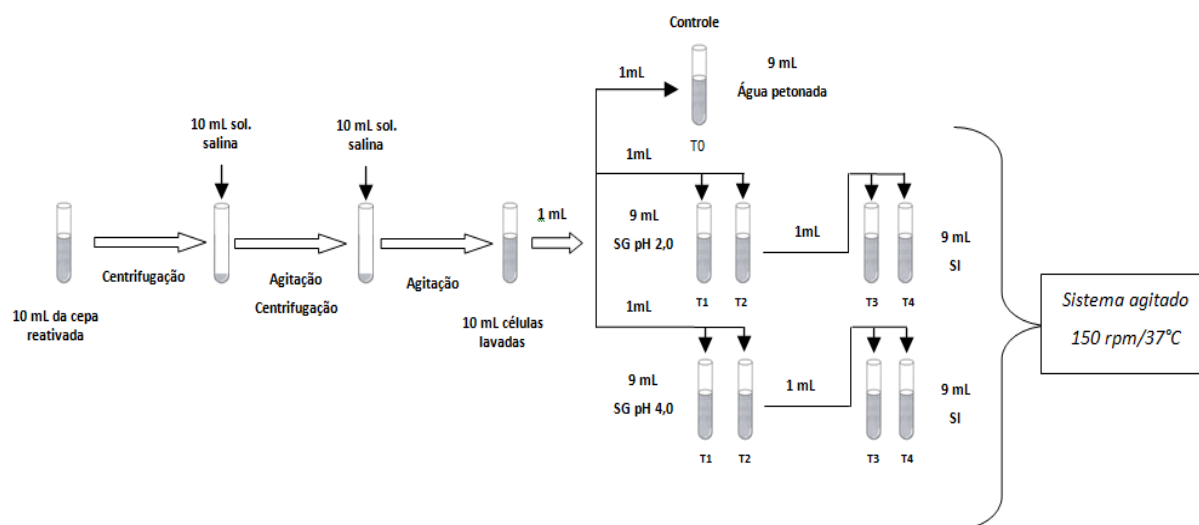


FIGURA 4.1 – ETAPAS DA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA DO *P. acidilactici* B14 AO SISTEMA GASTROINTESTINAL

FONTE: Adaptado de FERNÁNDEZ, BORIS e BARBÉS (2003).

NOTA: T₁ - tempo de incubação 90 min em SG; T₂ - tempo de incubação de 180 min em SG; T₃- tempo de incubação de 270 min (180 min em SG + 90 min em SI); T₄ - tempo de incubação 360 min (180 min em SG + 180 min em SI);

A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3.087xg (Celm, Combate, Brasil) por 10 min. A biomassa separada foi lavada com solução salina estéril 0,9% (p/v) de cloreto de sódio, por duas vezes, e o *pellet* foi diluído com salina estéril no mesmo volume. O experimento controle foi realizado no tempo T₀ pela diluição seriada, das células lavadas, em água peptonada a 0,1% (p/v). Seguido de plaqueamento em ágar MRS pelo método *drop plate* e incubação a 37±1°C por 48 horas. Partindo ainda, da biomassa reconstituída (células lavadas) foram coletadas quatro alíquotas de 1 mL e adicionadas em tubos contendo 9 mL de SG em pH 2,0 e 9 mL de SG em pH 4,0, sendo incubados a 37±1°C em agitador orbital a 150 rpm. Após 90 e 180 min de incubação, os tubos denominados de T₁ e T₂, respectivamente, foram retirados e o conteúdo diluído, plaqueado e incubado conforme descrito anteriormente. Do conteúdo celular do tempo T₂ ainda foram coletadas, após agitação, alíquotas de 1 mL tanto do SG em pH 2,0, quanto do SG em pH 4,0 e adicionadas em tubos contendo 9 mL de SI. Estes tubos foram incubados a 37±1°C sob agitação de 150 rpm, permanecendo mais 90 (T₃) e 180 min (T₄) e em seguida, submetidos à diluição e plaqueamento. Desta forma, o SI do tempo T₃ totalizou 270 min de ensaio (180 min do tempo T₂+ 90 min do tempo T₃) e o SI do tempo T₄ finalizou a avaliação com 360 minutos (180 min do tempo T₂+ 180 min do tempo T₄).

2.2.3.6 Avaliação da capacidade de adesão

O padrão de aderência do *P. acidilactici* B14 foi determinado utilizando monocamadas da linhagem celular HRT-18 (célula epitelial de adenocarcinoma de cólon humano– ATCC CCL-244). As células foram cultivadas em frascos de cultura com faces planas contendo meio de cultivo celular RPMI-1640 (solução nutritiva para células humanas e animais composta de uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes [Cultilab, São Paulo, Brasil]) suplementado com 10,0% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbald, Estados Unidos), 10 mg.L⁻¹ (p/v) de estreptomicina (Cultilab) e 10.000 UI.L⁻¹ de penicilina (Cultilab), mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37±1°C. Após remoção do tapete celular com tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) as células foram adicionadas em número de 2 x 10⁴/poço em microplacas (TPP, St. Louis, Estados Unidos) contendo lamínulas de vidro estéreis. As microplacas contendo as células foram incubadas a 37±1°C sob atmosfera de 5% em estufa de CO₂ (Quimis, Q316C, Brasil) por 48 horas. Para avaliação da adesão, as células foram lavadas duas vezes com tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS) estéril em pH 7,4, composto por 0,76% (p/v) de cloreto de sódio, 0,07% (p/v) de fosfato dissódico anidro (Biotec) e 0,021% (p/v) de fosfato monopotássico (Biotec) e uma vez com meio RPMI-1640. Foram adicionados, ao cultivo celular, 0,4 mL de meio RPMI-1640 com 10,0% (v/v) de soro fetal bovino e 0,1mL (v/v) da suspensão bacteriana com população de 10⁷ UFC.mL⁻¹. Após 75 min a 37±1°C, as culturas foram lavadas quatro vezes com tampão PBS estéril, fixadas com solução a 2,0% (v/v) de formaldeído (Sigma-Aldrich) durante 2 min e submetidas à coloração de *May-Grünwald-Giemsa*. Após a coloração, as lamínulas foram lavadas em água destilada, montadas, vedadas e analisadas em microscópio óptico (Olympus, EX-41, Brasil) com sistema de captura de imagem (DP72).

2.2.4 Desenvolvimento da cultura associada

O objetivo de associar a cepa de *P. acidilactici* B14 testada com outra BAL foi de ampliar as propriedades de uma cultura com potencial probiótico e de origem diferenciada a um gênero, de bactérias, aceito como probiótico pela legislação

brasileira vigente. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina por meio da “Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas” que são legalmente considerados probióticos, os seguintes micro-organismos: *Lb. acidophilus*, *Lb. casei shirota*, *Lb. casei rhamnosus*, *Lb. casei defensius*, *Lb. paracasei*, *Lac. lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis (lactis)*, *B. longum* e *E. faecium* (BRASIL, 2008). Embora se tenha ciência de que as propriedades probióticas são específicas às linhagens dos micro-organismos. Outra característica importante é que estas espécies são anaeróbias facultativas, além de terem suas propriedades probióticas extensivamente estudadas e aplicadas na indústria de alimentos e de medicamentos. O gênero *Bifidobacterium* não foi considerado nesta avaliação por crescer preferencialmente em ambientes anaeróbios, característica que dificultaria a sua viabilidade em uma matriz alimentar aerada.

2.2.4.1 Determinação da cultura associada

Para a escolha da cultura a ser associada com o *P. acidilactici* B14 foi utilizado o método *spot-on-the-lawn* (MARTINS *et al.*, 2006). Sobre o ágar MRS foram depositadas, gotas de 5µL do caldo fermentado, por 16 h, com a cepa produtora, sendo as placas incubadas por 48 h a 37±1°C. Na sequência foram vertidos sobre a placa 10mL de caldo MRS com 1,0% (p/v) de ágar bacteriológico e 10,0% (v/v) de caldo MRS com a cepa reveladora a 10,0% (v/v). A placa foi mantida por 12 h a 4±1°C e em seguida incubada a 37±1°C por 72 horas. A linhagem produtora foi o *P. acidilactici* B14 e as linhagens reveladoras utilizadas foram *Lb. acidophilus* ATCC 4356, *Lb. casei rhamnosus* H-19 e *Lb. paracasei* E-2. O antagonismo foi avaliado pelo diâmetro (mm) do halo de inibição formado.

2.2.4.2 Avaliação das características de crescimento

A característica de crescimento das culturas *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na forma isolada e associada foi determinada em sistema de cultivo estático a 37±1°C durante 12 h, com intervalos de 2 horas.

Para a curva de crescimento foi empregado o caldo MRS como meio de cultivo, as cepas na forma isolada foram reativadas em caldo nutriente (Himedia) a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 16 h e adicionadas ao meio de cultivo na concentração de 1,0% (v/v). A contagem celular foi realizada conforme descrito anteriormente em ágar MRS nas condições de $37\pm1^{\circ}\text{C}$ no tempo de 48 h para *P. acidilactici* B14 e 72 h para *Lb. acidophilus* ATCC 4356.

Para a curva de crescimento da cultura associada foi utilizado caldo MRS como meio de cultivo. As culturas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 foram reativadas isoladamente em caldo nutriente a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 16 h, associadas na proporção (1:1) no momento do uso e adicionadas na concentração de 1,0% (v/v) ao meio de cultivo. A contagem celular foi realizada conforme já descrito em ágar MRS nas condições de $37\pm1^{\circ}\text{C}$ no tempo de 72 horas.

A taxa específica de crescimento microbiano foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 4.3 (DI CAGNO *et al.*, 2011).

$$\mu = \frac{\Delta PC}{\Delta t} = \frac{PC - PC_0}{t - t_0} \quad (4.3)$$

Onde:

μ - taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1});

PC – população celular obtida em tempo qualquer ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$);

PC_0 – população celular inicial obtida ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$);

t – tempo qualquer (horas);

t_0 – tempo inicial (horas);

2.2.4.3 Avaliação da produção de ácido láctico

Para determinação da curva de produção de ácido láctico, as culturas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 tanto na forma isolada quanto associada foram submetidas ao crescimento em sistema estático a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Foi empregado o caldo MRS como meio de cultivo e as cepas foram reativadas em caldo nutriente (Himedia) a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 16 h e adicionadas ao meio de cultivo na concentração de 1,0% (v/v).

O ácido láctico foi quantificado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, LC-10 AD, Japão) operando com coluna de 30 cm, Aminex HPX-87H (BIO-RAD, Rio de Janeiro, Brasil) e acoplado com detector de índice de refração. As condições de trabalho foram: solução 5mM de ácido sulfúrico (Biotec) como fase móvel, com vazão de 0,6 mL.min⁻¹, pressão da bomba de 50-54 Kgf.cm⁻² e temperatura do forno de 60±1°C em condições isocráticas. O volume injetado foi de 50µL e o volume analisado de 20µL.

As amostras foram centrifugadas (Fischer Scientific, micro 14, Inglaterra) a 7.200xg por 15 minutos, diluídas em água ultra pura e filtradas em membrana de éster celulose (Millipore, Billerica, Estados Unidos) de 0,22µm de poro. Como padrão foi utilizada uma solução de 2g.L⁻¹ de ácido láctico (Reagen, Curitiba, Brasil). A produtividade em produto foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 4.4.

$$P_p = \frac{P_m - P_0}{t_f} \quad (4.4)$$

Onde:

P_p – produtividade em produto (g.L⁻¹.h⁻¹);

P_m – produção média referente ao tempo total ou final da fermentação (g.L⁻¹);

P_0 – produção inicial (g.L⁻¹);

t_f – tempo final da fermentação (h);

2.2.4.4 Capacidade de acidificação em extrato aquoso de soja

Com o objetivo de empregar a cultura associada desenvolvida em uma matriz alimentar formulada com extrato aquoso de soja (EAS), foi considerado relevante avaliar a característica de acidificação nesta matéria-prima.

Para a capacidade de acidificação as cepas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na forma isolada e associada foram inoculadas na concentração de 3,0% (v/v) em EAS estéril (121±1°C/5min) isento de aditivos químicos, produzido na Unidade de Produção de Alimentos da Prefeitura Municipal de Ponta Grossa (Brasil). A fermentação foi conduzida a 37±1°C por 96h tanto no tratamento controle (Trat.1), quanto no tratamento com suplementação de 1,0% (p/v) com glicose (Merck) (Trat.2).

A capacidade de acidificação em EAS foi determinada pela acidez total titulável (IAL, 2008) e pela determinação do pH em pHmetro digital (Tecnal, TEC-2mp, Brasil).

2.2.4.5 Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal

A simulação, *in vitro*, da resistência da cultura associada ao SGI foi semelhante ao descrito no item 2.2.3.5 deste capítulo, exceto para a obtenção da suspensão bacteriana e as condições de incubação das placas. A suspensão bacteriana utilizada para a avaliação de resistência ao SGI foi obtida na concentração de 1,0% (v/v), sendo as cepas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 cultivadas na forma isolada a 1,0% (v/v) em caldo MRS a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16 h e associadas na proporção (1:1) no momento do uso. Após o plaqueamento, as condições de incubação foram $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

2.2.5 Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos pela média das triplicatas e respectivos desvios padrão. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) usando o pós-teste de *Tukey*, com erro de $p < 0,05$, em programa SASM-Agri, versão 8.2 (CANTERI *et al.*, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DO *P. acidilactici* B14

3.1.1 Determinação da concentração do ácido láctico

A linhagem B14 de *P. acidilactici* foi capaz de sintetizar 8,09 g.L⁻¹ de D(-)-ácido láctico e 11,53 g.L⁻¹ de L(+)-ácido láctico. A proporção (L:D) obtida entre a formação da mistura racêmica foi de (1,4:1) portanto, a soma da mistura racêmica do ácido láctico foi de 19,62 g.L⁻¹.

A produção de isômeros de ácido láctico (L (+) e D (-)) surge como resultado da estereoespecificidade da lactato-desidrogenase, ou mais raramente, pela ação de L-lactato-racemase induzida, em combinação com uma L-lactato-desidrogenase presente na célula (INÊS *et al.*, 2008) e varia com o gênero e a espécie da BAL (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Albano *et al.* (2009) verificaram que a cepa *P. acidilactici* HA-6111-2, isolada do embutido cárneo “alheira”, produziu 9,01 g.L⁻¹ e 3,07 g.L⁻¹ dos isômeros L(+) e D(-) ácido láctico, respectivamente, obtendo uma razão de (3:1) para a mistura racêmica (L:D).

A formação de ácido láctico em cepas do gênero *Pediococcus*, pode ser tanto na forma racêmica como foi observado para a estirpe investigada, quanto na forma do L(+) lactato.

3.1.2 Avaliação da resistência ao pH ácido e sais biliares

A resistência nativa a acidez gástrica é uma rara propriedade probiótica, sendo essencial para a proteção de bactérias em sistemas com baixo pH (JENSEN *et al.*, 2012).

Na avaliação da resistência do *P. acidilactici* B14 em várias condições de pH, apresentada pelo GRÁFICO 4.1, a viabilidade desta cultura para o tempo de 180 min, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições pesquisadas. Também, foi observada uma redução de 52,76, 30,08 e 12,28%, em relação à população do experimento controle (pH 6,5), no pH de 1,3, 2,5 e 4,0,

respectivamente. No ensaio controle, em 180 min, a redução observada foi de 36,36% decorrente da fase de adaptação do crescimento bacteriano. Para o tempo de 360 min, a estirpe não foi resistente nas três condições avaliadas de pH.

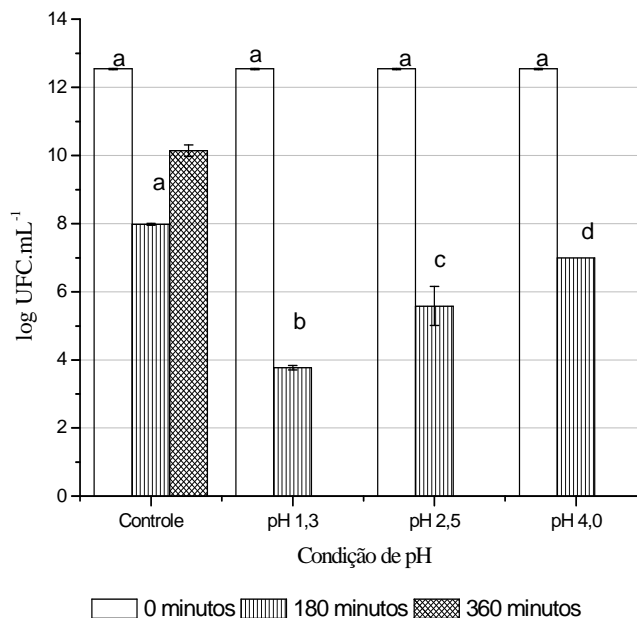


GRÁFICO 4.1 - VIABILIDADE DO *P. acidilactici* B14 EM PRESENÇA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, DURANTE 360 MINUTOS

NOTA: Letras diferentes entre os tratamentos para o mesmo tempo, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey)

Quando um micro-organismo é exposto às condições ácidas, o pH de homeostase é mantido por uma expulsão de H^+ da célula, sendo esse processo dependente da atividade de H^+ -ATPase, enzima responsável por manter a concentração de H^+ entre a célula e o meio (MATSUMOTO *et al.*, 2004). A tolerância a acidez de BAL têm sido associada à indução da atividade de H^+ -ATPase (GUO *et al.*, 2009).

Erkkila e Petäjä (2000) ao avaliar cepas isoladas de culturas *starter* para produtos cárneos verificaram que o *P. acidilactici* PA-2 apresentou viabilidade, em pH 3,0, de 7,5 a 7,1 log UFC.mL⁻¹ durante 4 h de ensaio, sendo considerada resistente à acidez em relação as demais culturas analisadas. Embora o *P. acidilactici* B14, não tenha sido avaliado em pH 3,0, para 180 min (3 h) foram obtidas as populações de 5,58 log UFC.mL⁻¹ e 7,00 log UFC.mL⁻¹ em pH 2,5 e 4,0, respectivamente. De acordo com Park *et al.* (2006) para que uma bactéria possa ser considerada probiótica, ela deve sobreviver entre os pH 2,0 e 3,0 durante 3 horas. A

cepa pesquisada, ao final de 3 horas em pH 2,5, apresentou 44,49% de sobrevivência.

Na avaliação da tolerância do *P. acidilactici* B14 frente aos sais biliares, conforme apresentado no GRÁFICO 4.2, foi observado nos tempos de 180 e 360 min diferenças significativas ($p < 0,05$) na viabilidade da cepa entre os tratamentos propostos (controle, 0,3 e 1,0%). Ao final dos 360 min, houve redução de 2 ($6,94 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 4 ($4,86 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) ciclos logarítmicos do tratamento controle ($8,98 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) para 0,3 e 1,0% de sais biliares, respectivamente.

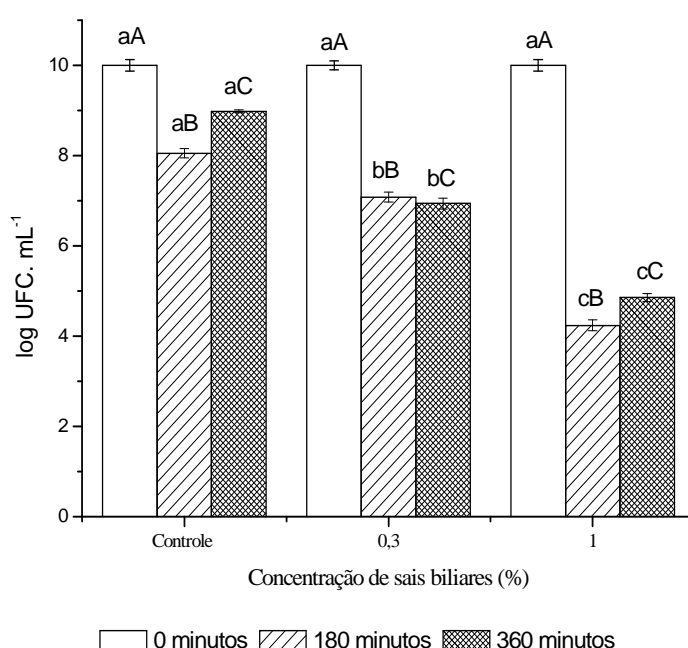


GRÁFICO 4.2 - TOLERÂNCIA DO *P. acidilactici* B14 FRENTE AOS SAIS BILIARES

NOTA: Letras minúsculas diferentes entre os tratamentos, para o mesmo tempo, e letras maiúsculas diferentes no tratamento, em tempos diferentes, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey)

Outra barreira que as bactérias probióticas devem transpor é a bile presente no intestino delgado, no qual o tempo de trânsito do alimento é geralmente entre 1 e 4 horas. Os sais biliares são os principais componentes da bile, capazes de desorganizar a estrutura de membranas celulares e, dessa forma, mostram toxicidade às células vivas (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006). De acordo com Gowri e Ghosh (2010), o nível normal de sais biliares no intestino é de aproximadamente 0,3%. A estirpe B14 de *P. acidilactici*, na concentração de 0,3% apresentou uma sobrevivência de 70,80 e 69,40% para 180 e 360 min, respectivamente. Portanto, a

linhagem investigada apresentou resistência para a concentração de sais biliares presente no intestino delgado.

3.1.3 Avaliação da resistência aos antibióticos

Os probióticos devem exibir tolerância aos antimicrobianos usados na prática clínica, porém, não devem ser capazes de transferir essa resistência a outras bactérias, comensais ou oportunistas (DEL PIANO *et al.*, 2006).

Devido à ausência de padrões de comportamento frente a antimicrobianos para BAL, os diâmetros dos halos de inibição obtidos para a cepa *P. acidilactici* B14 foram comparados com os padrões interpretativos do gênero *Enterococcus*. Na TABELA 4.1, pode ser verificado que a cultura investigada apresentou sensibilidade aos discos com os antimicrobianos amoxicilina (10µg), clindamicina (02µg), clorenanfenicol (30µg), eritromicina (15µg) e imipenem (10µg). A presença do composto tetraciclina (30µg) inibiu parcialmente a atividade da cepa, e os antibióticos cefalexina (30µg), cefotaxima (30µg), neomicina (30µg), penicilina G (10µg) e vancomicina (30µg) foram tolerados pelo *P. acidilactici* B14. Portanto, a cepa apresentou tanto sensibilidade, quanto resistência para 45,45% dos compostos avaliados.

TABELA 4.1 - COMPORTAMENTO DA CEPA *P. acidilactici* EM PRESENÇA DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS

Antibiótico	Concentração (µg.disco ⁻¹)	Padrões Interpretativos* Diâmetro do halo de inibição (mm)			Diâmetro do halo de inibição (mm)
		Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)	
Amoxicilina	10	≤14	-	≥15	17,00±2,00 (S)
Cefalexina	30	≤14	15-17	≥18	12,13±2,49 (R)
Cefotaxima	30	≤22	23-25	≥26	NI** (R)
Clindamicina	02	≤14	15-20	≥21	24,80±0,98 (S)
Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	20,00±3,00 (S)
Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23	24,83±1,59 (S)
Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	29,17±2,02 (S)
Neomicina	30	≤12	13-16	≥17	11,40±1,39 (R)
Penicilina G	10	≤14	-	≥15	24,27±2,05 (R)
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	15,75±0,45 (I)
Vancomicina	30	≤14	15-16	≥17	NI (R)

NOTA: *NCCLS (2010); Macedo *et al.* (2005); **NI - não houve formação de halo de inibição.

Silva (2011) ao avaliar a resistência de duas cepas de *P. pentosaceus*, isoladas do queijo São Jorge, por antibióticos utilizando o método de disco-difusão obteve resistência destes micro-organismos para os compostos cloranfenicol, clindamicina, ampicilina, gentamicina, penicilina, norfloxacin, lincomicina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetoprim e sensibilidade intermediária para a norfloxacin.

O elevado índice resistência de BAL por antibióticos isoladas de leite e derivados lácteos, pode ser devido ao uso frequente destes compostos na medicina veterinária. Porém, para as cepas de BAL isoladas de vegetais, que não possuem contato com essa classe de substâncias químicas, era esperado um índice menor de resistência.

A resistência à vancomicina apresentada pela linhagem de *P. acidilactici* B14, é inerente ao gênero *Pediococcus* como afirmam Toomey, Bolton e Fanning (2010), que o alto valor da concentração inibitória mínima (CIM>256 mg.L⁻¹) para a vancomicina, encontrado em cepas de pediococos é devido à conhecida resistência intrínseca aos glicopeptídeos das bactérias deste gênero.

De acordo com Rabia e Shah (2011) existem três tipos de resistência a antibióticos: natural, adquirida e mutacional. Para Liu *et al.* (2009) esta resistência pode ocorrer por mutação de um gene endógeno ou aquisição de um gene resistente a partir de uma fonte exógena.

Rojo-Bezares *et al.* (2006) ao testarem a susceptibilidade de antibióticos em BAL detectaram na cepa *P. acidilactici* J83 o gene *erm*(B) de resistência para a eritromicina. Entretanto, Klare *et al.* (2007) avaliando o percentual de resistência adquirida de isolados de pediococos frente a 16 antibióticos, entre eles a eritromicina, verificaram em 29 cepas de *P. acidilactici* ausência de resistência adquirida para os compostos avaliados. Para a estirpe de *P. acidilactici* B14, avaliada neste estudo, a sensibilidade à eritromicina foi confirmada.

3.1.4 Determinação da resistência frente à patógenos

As BAL são capazes de sintetizar durante a fermentação compostos como ácidos, peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas ou proteínas bactericidas

capazes de desempenhar atividade inibitória frente a micro-organismos patogênicos (SIVAKUMAR; RAJAMANI; SAIF, 2010).

A FIGURA 4.2 apresenta os halos de inibição formados, proveniente do antagonismo da cepa *P. acidilactici* B14 frente ao *S. aureus* ATCC 6538P, em condição de meio tamponado.



FIGURA 4.2 - CULTURA DE *P. acidilactici* B14 E O PATÓGENO *S. aureus* ATCC 6538P, EM MEIO TAMPONADO

Como a cepa de *P. acidilactici* B14 foi avaliada como homofermentativa (item 3.2, Capítulo III) e produtora de ácido láctico na forma racêmica (item 3.1.1, Capítulo IV), se considera que não são formados compostos como dióxido de carbono e etanol em sua via metabólica. Portanto, como pode ser observado na TABELA 4.2, a atividade inibitória aos patógenos testados pode ser devido à presença de acidez, peróxido de hidrogênio e possíveis compostos antimicrobianos excretados. Os resultados demonstraram que a redução nos diâmetros dos halos de inibição foi significativa ($p < 0,05$) para os patógenos testados, quando o meio foi tamponado.

O efeito antagônico obtido para a cepa *E. coli* ATCC 25922, micro-organismo *Gram*-negativo, parece ser totalmente dependente da acidez, já que em meio tamponado não houve inibição. Porém, para os patógenos *Salmonella* sp., *B. cereus* ATCC 33018 e *S. aureus* ATCC 6538P o halo de inibição foi reduzido em

30,85, 6,55 e 8,05%, respectivamente, quando avaliada a dependência do antagonismo à acidez.

Os patógenos *Gram*-negativos testados (*E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella sp.*) apresentaram maior sensibilidade ao efeito inibidor do ácido presente. Porém, nas cepas *Gram*-positivas (*B. cereus* ATCC 33018 e *S. aureus* ATCC 6538P) outros possíveis mecanismos, como a presença de peróxido de hidrogênio e/ou de substâncias antimicrobianas podem, também, estar atuando na inibição.

TABELA 4.2 – EFEITO ANTAGONISTA DO *P. acidilactici* B14 EM PRESENÇA DE PATÓGENOS

Tratamento	Diâmetro do halo de inibição (mm)			
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>B. cereus</i> ATCC33018	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P
Ágar MRS	27,00 ^a ± 1,73	25,33 ^a ± 1,15	16,00 ± 0,00	21,75 ^a ± 0,96
Ágar MRS tamponado	18,67 ^b ± 0,58	23,67 ^b ± 0,58	NI*	20,00 ^b ± 0,00

NOTA: *NI- não houve inibição do patógeno; Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença (p<0,05) (Pós-teste de Tukey)

Servin (2004) destaca a importância dos ácidos orgânicos quanto ao forte efeito inibidor contra bactérias *Gram*-negativas, em que o ácido láctico age como um permeabilizador da membrana externa destas bactérias, permitindo que outras substâncias antimicrobianas penetrem e, com isso, aumentam a susceptibilidade de patógenos às moléculas antimicrobianas.

Os metabólitos de oxigênio (peróxido de hidrogênio e radicais livres) apresentam efeito bactericida ou bacteriostático em relação aos micro-organismos patogênicos e deterioradores (PIARD; DESMAZEUD, 1991).

Algumas cepas de *Pediococcus spp.* produzem peptídeos antimicrobianos que inibem outras bactérias lácticas, patogênicas e deterioradoras *Gram*-positivas (GURIRA; BUYS, 2005). As bacteriocinas produzidas por pediococos são classificadas como classe IIa e tem alta atividade antimicrobiana, especialmente frente a *Listeria monocytogenes* (ALTUNTAS *et al.*, 2010).

3.1.5 Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal

Para sobreviver no intestino, os organismos devem ser tolerantes ao baixo pH do estômago, que geralmente varia de 2,5 a 3,5, mas pode ser de 1,5 durante ou de 4,5 após a refeição (HUANG; ADAMS, 2004).

O GRÁFICO 4.3 demonstra os resultados da viabilidade celular da estirpe de *P. acidilactici* B14, frente às condições do SGI simulado *in vitro*. Quando comparada a população obtida nas condições testadas de pH, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) durante os tempos avaliados de 90 a 360 minutos. Para os valores de viabilidade celular em pH 2,0, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tempos, e para o pH 4,0 não foi verificada diferença significativa nos tempos 180 e 270 min.

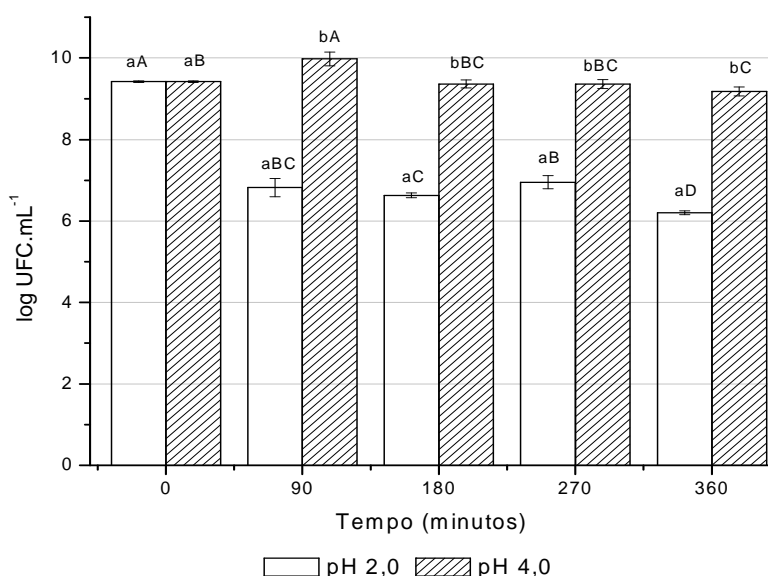


GRÁFICO 4.3 - RESISTÊNCIA DO *P. acidilactici* B14 AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO *IN VITRO*

NOTA: Letras minúsculas diferentes entre as condições de pH e letras maiúsculas diferentes entre os tempos apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey)

Ao analisar, de forma isolada, a presença do SG e SI na viabilidade celular, foram obtidos os seguintes resultados: no pH 2,0 o SG reduziu a população em 29,62% e o SI em 6,48%, para o pH 4,0 a redução foi de 0,64% no SG e 1,92% no SI. Pode ser observado que, a condição de maior acidez no ambiente gástrico influenciou a população bacteriana durante o trânsito estomacal assim como no sistema intestinal, caracterizando uma “fragilização” celular e tornando as células mais susceptíveis à ação dos componentes do SI.

Quando avaliada a permanência da cepa *P. acidilactici* B14, no SG em pH 4,0, foi verificada a redução de 0,64% da população inicial. No entanto quando esta cepa foi submetida em pH 4,0 (GRÁFICO 4.1), sem a presença de pepsina, a redução foi de 44,18%. A redução da perda de viabilidade celular de 44,18 para 0,64%, na condição de pH 4,0 em presença de pepsina, corrobora com resultados obtidos por Guo *et al.* (2009) que observaram ao submeter as cepas *Lb. casei* Zhang, *Lb. acidophilus* NCFM, *Lb. rhamnosus* GG e *B. animalis* Bb12 em contato com suco gástrico simulado em pH 2,5, 3,0 e 4,0, a presença da pepsina melhorou a sobrevivência dos probióticos nas condições ácidas testadas. Mättö *et al.* (2006) observaram que a suplementação com pepsina melhorou a sobrevivência da cepa *B. animalis* subsp. *lactis* durante a exposição a baixo pH, sendo este efeito não detectado em cinco outras cepas de bifidobactérias encontradas no TGI humano.

A sobrevivência dos probióticos durante o trânsito intestinal está estimada em aproximadamente 10-40% do número total administrado (MÄTTÖ *et al.*, 2006). Os resultados obtidos da sobrevivência do *P. acidilactici* B14 no tempo final de simulação do trânsito gastrointestinal (360 min), na condição de pH 2,0 e 4,0 no SG, foram de 65,82 e 97,45%, respectivamente (GRÁFICO 4.3), portanto, acima do observado pela literatura.

3.1.6 Avaliação da capacidade de adesão

A adesão nas células do epitélio intestinal é um importante pré-requisito para a colonização de cepas probióticas no TGI, prevenindo sua imediata eliminação pelos movimentos peristálticos e fornecendo uma vantagem competitiva neste ecossistema (KOS *et al.*, 2003). Este potencial é mensurado pela hidrofobicidade da superfície celular bacteriana e propriedade de autoagregação (KAUSHIK *et al.*, 2009). Assim como a capacidade de produção de exopolissacarídeo pode melhorar a aderência na mucosa intestinal e aumentar o tempo de permanência da bactéria no trato intestinal (ALP; ASLIM, 2010).

O padrão de aderência da cepa *P. acidilactici* B14 foi avaliado na linhagem celular HRT-18 de adenocarcinoma do cólon humano. A capacidade de adesão da estirpe pesquisada, para esta linhagem, foi de $0,64 \pm 0,10$ células de *P. acidilactici*

B14 por célula de adenocarcinoma. A FIGURA 4.3 ilustra a imagem obtida da adesão da bactéria *P. acidilactici* B14 em células HRT-18.

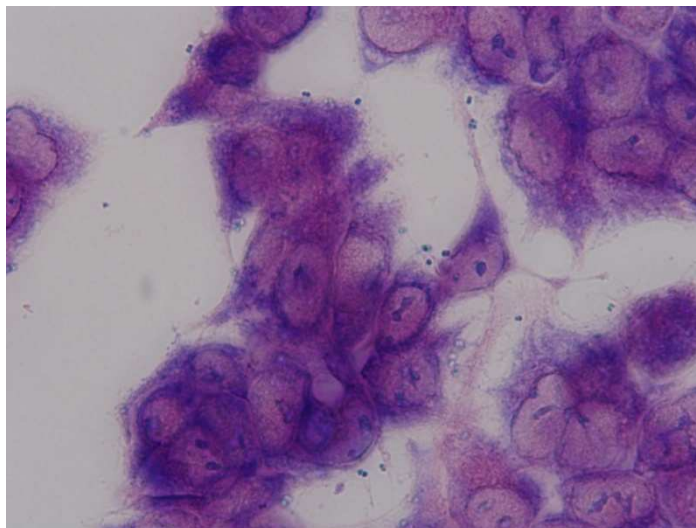


FIGURA 4.3 - IMAGEM OBTIDA DA ADESÃO DA BACTÉRIA *P. acidilactici* B14 EM CÉLULAS HRT-18

As linhagens celulares comumente empregadas para avaliar a adesão bacteriana são Caco-2 e HT-29, ambas provenientes de adenocarcinoma de cólon humano, assim como a HRT-18. Portanto, devido à escassez de relatos da utilização da linhagem HRT-18 foram considerados, para efeito de comparação, dados referentes à aderência de BAL em células Caco-2.

A capacidade de adesão do *P. acidilactici* B14 em células HRT-18 pode ser considerada ausente, quando seguido o padrão de alta adesividade (>40 bactérias/célula de Caco-2), adesividade intermediária (5-40 bactérias/célula de Caco-2) e não adesiva (<5 bactérias/ célula de Caco-2) proposto por Candela *et al.* (2005). Porém, considerando os parâmetros propostos por Del Re *et al.* (2000) que ao avaliar a capacidade de adesão de cepas de *B. longum* definiram como aderentes de 6 a 40 bactérias/100 células Caco-2 e com forte capacidade de adesão quando mais de 40 bactérias/100 células de Caco-2, desta forma a estirpe de *P. acidilactici* avaliada possui forte capacidade de adesão.

Devido à ausência de dados conclusivos quanto aos parâmetros propostos, para aderência de células bacterianas em modelos celulares do epitélio intestinal, não foi possível definir a característica quanto à capacidade de adesão da cepa avaliada.

3.2 DESENVOLVIMENTO DA CULTURA ASSOCIADA

3.2.1 Determinação da cultura associada

A capacidade da linhagem investigada de *P. acidilactici* B14 em inibir o crescimento dos micro-organismos selecionados foi estabelecida pelos diâmetros dos halos de inibição formados. Portanto, os diâmetros referentes ao antagonismo da estirpe de *P. acidilactici* B14 frente às cepas *Lb. paracasei* E-2 e *Lb. casei rhamnosus* H-19 foram de 13,00mm e 13,33mm, respectivamente. Para a cepa de *Lb. acidophilus* ATCC 4356 não foi formado halo de inibição, portanto, não existindo atividade antagônica com a cultura de *P. acidilactici* B14.

Embora os gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* pertençam filogeneticamente a família *Lactobacillaceae*, características inerentes às estirpes testadas como grau de tolerância ao meio ácido, presença de peróxido de hidrogênio e outras substâncias antimicrobianas, podem ter promovido o antagonismo entre o *P. acidilactici* B14, *Lb. casei rhamnosus* H-19 e *Lb. paracasei* E-2. Portanto, o cultivo associado entre as cepas de *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e *P. acidilactici* B14 foi definido e submetido à avaliação quanto à capacidade de crescimento.

3.2.2 Avaliação das características de crescimento

No GRÁFICO 4.4 estão apresentadas as curvas de crescimento das estirpes de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na forma isolada e como cultura associada. Com os dados obtidos nas curvas de crescimento, foi possível verificar que a partir de 10h de fermentação, houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas taxas de crescimento entre as cepas de *P. acidilactici* B14 ($0,466 \text{ h}^{-1}$) e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 ($0,521 \text{ h}^{-1}$) e a forma associada ($0,513 \text{ h}^{-1}$). Com 12 h de fermentação as cepas isoladas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e a forma associada, também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nas taxas de crescimento de $0,660 \text{ h}^{-1}$, $0,524 \text{ h}^{-1}$ e $0,365 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

As linhagens na forma isolada atingiram as taxas máximas de crescimento no tempo de 12h e na forma associada com 10 horas. Portanto, as culturas quando

associadas, apresentaram a taxa máxima de crescimento em 10h com diferença significativa das formas isoladas.

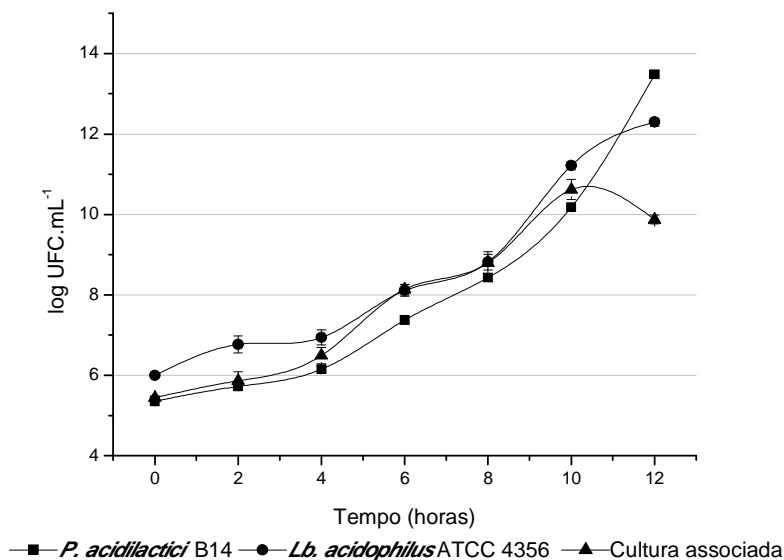


GRÁFICO 4.4 – CURVA DE CRESCIMENTO EM CALDO MRS, SISTEMA ESTÁTICO, A 37±1°C, DURANTE 12 HORAS

3.2.3 Avaliação da produção de ácido láctico

O GRÁFICO 4.5 apresenta a curva de produção de ácido láctico das cepas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na forma isolada e associada, durante 48 h de fermentação em sistema estático a 37±1°C. Para o *P. acidilactici* B14 a formação do ácido foi observada a partir de 8 h de fermentação com 1,37g.L⁻¹ e sua produção máxima foi em 24h com 18,97 g.L⁻¹, em 48 h foi observada uma tendência a estabilização na formação do ácido pelo valor obtido de 19,25 g.L⁻¹. Para o *Lb. acidophilus* ATCC 4356, a formação do produto foi observada em 2h de fermentação com 1,40 g.L⁻¹, com 24h o teor de ácido láctico foi de 12,50 g.L⁻¹ e atingindo 14,93g.L⁻¹ com 48 horas. Para a cultura associada à produção de ácido láctico iniciou com 1,5g.L⁻¹ em 6h de fermentação, sendo obtidos com 24 e 48 h os teores de 18,53 e 19,96 g.L⁻¹, respectivamente.

As concentrações de ácido láctico para as bactérias tanto na forma isolada quanto na forma associada, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados. Da mesma forma, a produtividade em produto calculada

apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para as cepas isoladas e associadas. O resultado obtido para este parâmetro foi de 0,40, 0,31 e 0,42 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o *P. acidilactici* B14, *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e cultura associada, respectivamente.

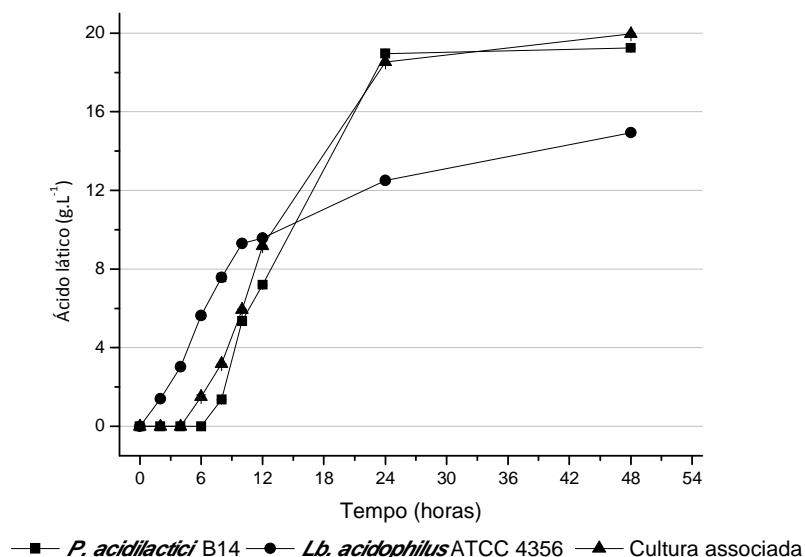


GRÁFICO 4.5 - CURVA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO EM SISTEMA ESTÁTICO

Quando analisados os GRÁFICOS 4.4 e 4.5, se observa que a diminuição do crescimento da cultura associada, pode estar relacionada com a produção de ácido láctico. Portanto, a maior acidez presente no meio pode ter inibido o metabolismo do *Lb. acidophilus* ATCC 4356, pois o teor de ácido láctico formado para a cultura associada e o *P. acidilactici* B14 foram semelhantes.

3.2.4 Capacidade de acidificação em extrato aquoso de soja

O GRÁFICO 4.6 apresenta os resultados da acidez total obtida pela fermentação das cepas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na forma isolada e associada em EAS com e sem suplementação de 1,0% (p/v) de glicose. Os valores máximos de acidez total (expressa em ácido láctico) no EAS sem suplementação foram de 0,140, 0,143 e 0,140 g.L^{-1} para *P. acidilactici* B14, *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e cultura associada, respectivamente. Estes valores não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os tempos avaliados. Quando foi realizada a suplementação no EAS os valores máximos de acidez total foram de

0,769, 0,176 e 0,772 g.L⁻¹ para *P. acidilactici* B14, *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e cultura associada, respectivamente. A cultura associada não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) da curva do *Lb. acidophilus* ATCC 4356 somente no tempo de 0 h e da curva do *P. acidilactici* B14 no tempo de 48 horas.

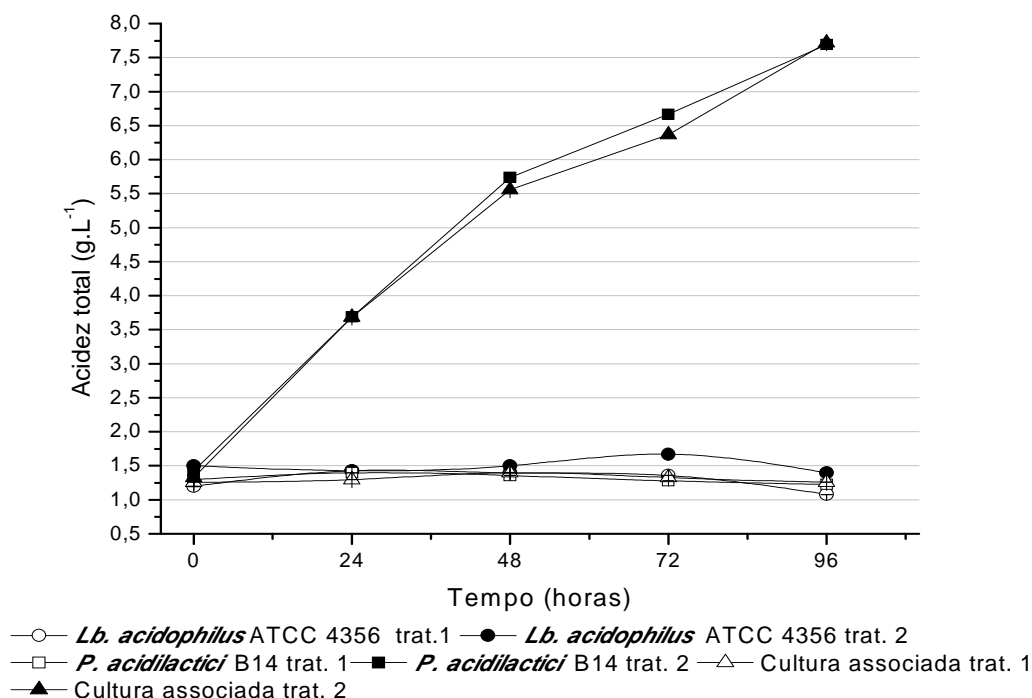


GRÁFICO 4.6 – CURVA DE ACIDIFICAÇÃO NO EXTRATO AQUOSO DE SOJA, EXPRESSA EM ACIDEZ TOTAL

Quando avaliada a evolução do pH no EAS com e sem suplementação de 1,0% (p/v) de glicose (GRÁFICO 4.7) foi observado comportamento semelhante ao apresentado para acidez total (GRÁFICO 4.6).

Para o *P. acidilactici* B14, *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e cultura associada em EAS sem suplementação, a variação de pH obtida foi de 6,03 a 5,91, 6,01 a 5,93 e 5,95 a 5,81, respectivamente. A cultura associada não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do *Lb. acidophilus* ATCC 4356 no tempo de 72 h e do *P. acidilactici* B14 em 24 horas.

Para o EAS suplementado com glicose, a variação obtida para o pH foi de 5,91 a 3,13, 6,01 a 5,79 e 5,92 a 3,13 para *P. acidilactici* B14, *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e cultura associada, respectivamente. Quando analisados os valores de pH obtidos para a cultura associada foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) em

todos os tempos avaliados para o *Lb. acidophilus* ATCC 4356 e em 24, 48 e 72h para o *P. acidilactici* B14.

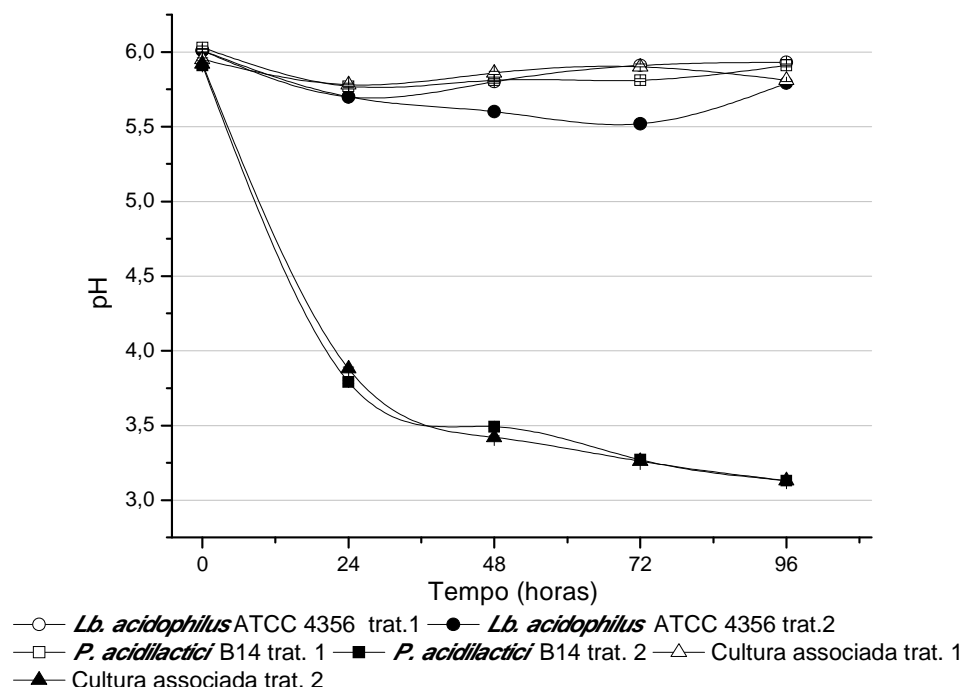


GRÁFICO 4.7 – CURVA DE ACIDIFICAÇÃO NO EXTRATO AQUOSO DE SOJA, EXPRESSA PELO pH

O comportamento das cepas *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na sua forma isolada e associada, avaliado nos GRÁFICOS 4.6 e 4.7, é similar ao observado nos gráficos anteriores (4.4 e 4.5) e demonstra que a cepa *Lb. acidophilus* ATCC 4356 pode ter sido inibida, mesmo em meio de EAS suplementado com glicose.

3.2.5 Avaliação da resistência ao sistema gastrointestinal

A sobrevivência e a colonização no trato digestivo são consideradas aspectos críticos para o aumento da funcionalidade e a expressão de funções fisiológicas de promoção à saúde por micro-organismos probióticos (MEIRA *et al.*, 2010).

No GRÁFICO 4.8, quando avaliada a população celular em ambas as condições de pH, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para os tempos de 90, 180, 270 e 360 minutos. A viabilidade celular em pH 2,0 foi reduzida em 5,28

ciclos logarítmicos, apresentando diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de 0, 90 e 180. Para o pH 4,0, houve redução de 0,94 ciclos logarítmicos e com diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de 0, 90 e 180.

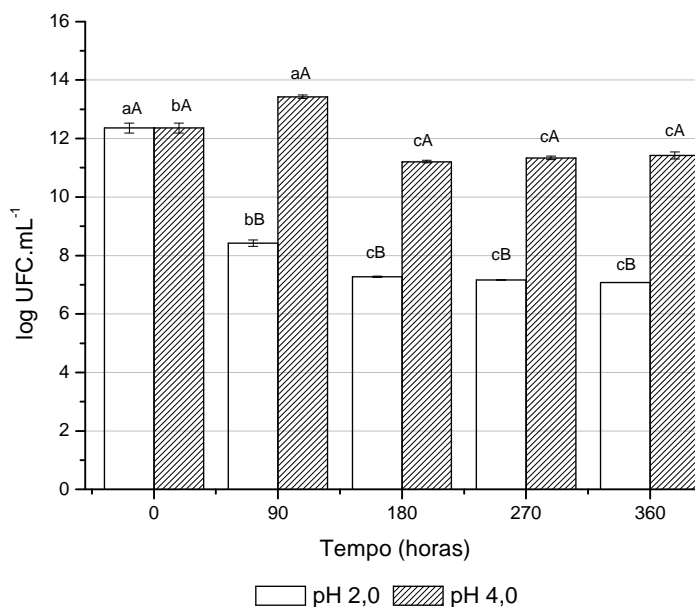


GRÁFICO 4.8 - RESISTÊNCIA DA CULTURA ASSOCIADA AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO *IN VITRO*

NOTA: Letras minúsculas diferentes entre os tempos e letras maiúsculas diferentes nas condições de pH apresentam diferença significativa ($p<0,05$) (Pós-teste de Tukey)

Os resultados obtidos para sobrevivência da cultura associada para o trânsito no TGI, na condição de pH 2,0 e 4,0 no SG, foram de 57,28 e 92,39%, respectivamente. Ainda estão de acordo com Mättö *et al.*, (2006) determinam que a sobrevivência para os probióticos durante o trânsito intestinal está estimada em aproximadamente 10-40% do número total administrado.

Quando comparados estes resultados com o *P. acidilactici* B14 avaliado isoladamente, foi observada uma redução na viabilidade em 8,54% na condição do pH 2,0 e 5,08% para pH 4,0. Buriti (2008) considerou que a cepa de *Lb. acidophilus* La-5 apresentou significativa sensibilidade às condições gástricas (pH~2,0). Portanto, a redução obtida na viabilidade pode estar diretamente relacionada com a sensibilidade da cepa de *Lb. acidophilus* ATCC 4356, empregada na cultura associada.

Embora os resultados para a sobrevivência ao TGI indiquem uma redução da viabilidade celular da cultura associada, quando comparada à cepa isolada de *P. acidilactici* B14, a ausência de antagonismo, a redução em 2h na taxa máxima de crescimento, a produtividade em ácido láctico de $0,42\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o potencial de acidificação no EAS quando suplementado com glicose, expresso em acidez total de $0,772\text{ g.L}^{-1}$ e pH de 3,13, representam uma ausência de efeitos antagônicos ou provável simbiose entre estas culturas.

4 CONCLUSÕES

A cepa de *P. acidilactici* B14 apresentou capacidade de produção de ácido láctico na forma racêmica com proporção de L:D de 1,4:1, viabilidade de 44,49% em pH 2,5 e de 70,80% para 0,3% de sais biliares durante 3h, tolerância para os antimicrobianos cefalexina, cefotaxima, neomicina, penicilina G e vancomicina, satisfatório antagonismo frente aos patógenos *Salmonella* sp., *B. cereus* ATCC 33018, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 6538P, índice de sobrevivência de 65,82 e 97,45% quando submetida ao SGI em pH 2,0 e 4,0, respectivamente e quanto à capacidade de adesão, foi obtida a aderência de 64 bactérias/ 100 células HRT-18 de adenocarcinoma humano.

Para a linhagem de *P. acidilactici* avaliada, não observada atividade antagonica frente à cepa *Lb. acidophilus* ATCC 4356. Considerando esta ausência de antagonismo, foi verificada redução em 2h na taxa específica de crescimento, produtividade em ácido láctico de 0,42 g.L⁻¹.h⁻¹, acidez total de 0,772 g.L⁻¹ em EAS suplementado com glicose e a sobrevivência de 57,28% (pH 2,0) e 92,39% (pH 4,0) após a passagem no TGI para a cultura associada do *P. acidilactici* B14 com *Lb. acidophilus* ATCC 4356.

A cepa de *P. acidilactici* B14 avaliada quanto ao seu potencial probiótico apresentou dados, que de acordo com a literatura atual, pode ser considerada um micro-organismo potencialmente probiótico.

A cultura associada de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 pode ser aplicada em simbiose com ingredientes funcionais em uma matriz alimentar.

REFERÊNCIAS

- AHMED Z.; WANG, Y.; CHENG, Q.; IMRAN, M. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.20, p.2843-2850, 2010.
- ALBANO, H.; PINHO, C.; LEITE, D.; BARBOSA, J.; SILVA, J.; CARNEIRO, L.; MAGALHÃES, R.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. **Food Control**, v.20, p.764-770, 2009.
- ALP, G.; ASLIM, B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk. **Anaerobe**, v. 16, p.101-105, 2010.
- ALTUNTAS, E.G.; COSANSU, S.; AYHAN, K. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.28-31, 2010.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1729-1738, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão técnico-científica de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 24/05/2011.
- BURITI, F.C.A. **Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro***. 144 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- CAMPANA, R.; FEDERICI, S.; CIANDRINI, E.; BAFFONE, W. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*. **Current Microbiology**, v.64, p.371-378, 2012.
- CANDELA, M.; SEIBOLD, G.; VITALI, B.; LANCHENMAIER, S.; EIKMANN, B.J.; BRIGIDI, P. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. **Research in Microbiology**, v.156, p. 887-895, 2005.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos *Scoft-Knott*, *Tukey* e *Duncan*. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.
- CRUZ, A G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v.42, p.1233-1239, 2009.
- DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G.P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v.38, p. S248-S255, 2006.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALEZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.438-442, 2000.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C.G.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Effect of lactic fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiology**, v.28, p.1062-1071, 2011.

ERKKILA, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter culture at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v.55, p.297-300, 2000.

FERNÁNDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.449-455, 2003.

FOLIGNÉ, B.; DEWULF, J.; BRETON, J.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; PROT, B. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, p.136-145, 2010.

GOWRI, S.; GHOSH, A.R. *Pediococcus* spp. – a potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequences analysis. **African Journal Food Science**, v.4, p.597-602, 2010.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.M.; ZHANG, H.P. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT: Food Science and Technology**, v.42, p.1640-1646, 2009.

GURIRA, O.Z.; BUYS, E.M. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. **Food Microbiology**, v.22, p.159-168, 2005.

HAAKENSEN, M.; VICKERS, D.M.; ZIOLA, B. Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. **BMC Microbiology**, v. 9, p.1-7, 2009.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992, p. 151-170.

HUANG, Y.; ADAMS, M.C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.253-260, 2004.

HUANG, Y.; ZHENG, Y. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like in Caco-2 cells. **British Journal of Nutrition**, v.103, p. 473-478, 2010.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico químicos para análise de alimentos**. 4.ed. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho – parte 1. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23, p.81-96, 2008.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K. AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.216-22, 2012.

KAUSHIK, J.K.; KUMAR, A.; DUARY, R.K.; MOHANTY, A.K.; GROVER, S.; BATISH, V.K. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. **Plos One**, v.4, p.1-11, 2009.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, B.; MÜLLER-BERTLING, S.; WITTE, W.; GOOSSENS, H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.900-912, 2007.

KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; ŠIMPRAGA, M.; FREE, J.; MATOŠIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal Applied Microbiology**, v.94, p.981-987, 2003.

LEE, S.H.; LILLEHOJ, H.S.; DALLOUL, R.A.; PARK, D.W. HONG, Y.H.; LIN, J.J. Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.63-66, 2007.

LIU, C.; ZHANG, Z.Y.; DONG, K.; YUAN, J.P.; GUO, X.K. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.22, p.401-412, 2009.

MACEDO, R.E.F.; PLANZER JÚNIOR, S.B.; TERRA, N.N.; FREITAS, R.J.S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **Boletim do CEPPA**, v.23, p.123-134, 2005.

MARTINS, A.D.de O.; MENDONÇA, R.C.S.; SILVA D.L.; RAMOS, M.S.; MARTINS, M.C.; DONZELE, J.L.; ANDRADE, N.J. de. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.5, p.53-59, 2006.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, p.109-113, 2004.

MÄTTO, J.; ALAKOMI, H.L.; VIRKAJÄRVI, A.V.I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v.16, p.1029-1037, 2006.

MEIRA, S. M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V.; MEDINA, L.F. da C.; BRANDELLI, A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**, III SSA, p.75-80, 2010.

MONTEAGUDO-MERA, A. RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; FERRERO, M.A. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v.4, p.531-541, 2012.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Padronização dos testes de sensibilidade por disco-difusão: norma aprovada. 8 ed. Documento M2-A8, v.23, n.1. NCCLS: Wayne, 2003.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos – método de disco-difusão. Critérios de interpretação dos diâmetros dos halos de inibição para estafilococos, enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. NCCLS: Wayne, 2010.

OGIER, J.C.; SERRA, P. Safety assessment of dairy microorganism: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.291-301, 2008.

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S.; Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.514-522, 2009.

PARK, S.C.; HWANG, M.H.; KIM, Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.; JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.35-37, 2006.

PERES, C.M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v.36, p.31-42, 2012.

PIARD, J.C.; DESMAZEUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. **Lait**, v.71, p.525-541, 1991.

RABIA, A. SHAH, N.P. Review article: antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. **International Food Research Journal**, v.18, p.59-75, 2011.

ROJO-BEZARES, B.; SÁENZ, Y.; POETA, P.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.234-240, 2006.

ROSSI, M.; CORRADINI, C.; AMARETTI, A.; NICOLINI, M.; POMPEI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6150-6158, 2005.

SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.405-440, 2004.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1262-1277, 2007.

SILVA, L. de J. M. da. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge DOP**. 99 fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2010.

SIVAKUMAR, N.; RAJAMANI; SAIF, A.B. Partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.1177-1184, 2010.

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.de S.; SPIER, M.R.; MEDEIROS, A.B.P.; YAMAGUSHI, C.T.; LINDNER, J.D.D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCOL, V. The potencial of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v.48, p.413-434, 2010.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p.1-29, 1997.

TAKATA, K.; KINOSHITA, M.; OKUNO, T.; MORIYA, M.; KOHDA, T.; HONORAT, J.A.; SUGIMOTO, T.; KUMANOGOH, A.; KAYAMA, H.; TAKEDA, K.; SAKODA, S.; NAKATSUJI, Y. The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. **PloS One**, v.6, p. 1-7, 2010. Disponível em:<<http://plosone.org>>. Acesso em 20/05/2012.

TOOMEY, N.; BOLTON, D.; FANNING, S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. **Research in Microbiology**, v.161, p. 127-135, 2010.

URNAU, D.; CIROLINI, A.; TERRA, N.N.; CAVALHEIRO, C.P.; MILANI, L.I.G.; FRIES, L.L.M. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, p.5-10, 2012.

VITALI, B.; MINERVINI G.; RIZZELLO, C.G.; SPISNI, E.; MACCAFERR, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v.31, p.116-125, 2012.

CAPÍTULO V – APLICAÇÃO DA CULTURA ASSOCIADA DE *Pediococcus acidilactici* B14 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 PARA OBTENÇÃO DE SOBREMESA COM SOJA AERADA, POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA

RESUMO

Nos produtos probióticos e simbióticos a matriz alimentar empregada influencia de maneira direta a viabilidade da cultura probiótica nas diversas condições fisiológicas e tecnológicas a que será submetida. Portanto é de fundamental importância definir a relação de dependência matriz-cepa para se obter sucesso no desenvolvimento de tais alimentos. O objetivo do presente trabalho foi aplicar a cultura associada de *P. acidilactici* e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 como cultivo potencialmente probiótico em uma sobremesa com soja aerada prebiótica, originando um produto potencialmente simbiótico, avaliar a estabilidade desta sobremesa durante o período de vida de prateleira e seu custo final estimado de fabricação. A sobremesa aerada formulada com extrato aquoso de soja, derivados lácteos, polpa de maracujá, ingredientes prebióticos, agentes edulcorantes, geleificantes, emulsificantes e conservantes, foi submetida ao armazenamento refrigerado (4°C) por 28 dias, sendo avaliada no intervalo de cada 7 dias. Os resultados para a viabilidade celular da cultura associada variaram de 9,82 (1 dia) a 9,26 (28 dias) log UFC.120g⁻¹, mantendo o produto adequado quanto à legislação vigente durante o período de estocagem, quando avaliada a resistência da cultura associada frente a condições simuladas *in vitro* do sistema gastrointestinal em pH 2,0 e 4,0, foram observadas reduções de 32,72 e 1,92%, respectivamente. A presença da sobremesa aerada como matriz alimentar promoveu um aumento de 10,00 e 5,68% na população celular, quando comparada a cultura associada na forma livre submetida às mesmas condições simuladas do sistema gastrointestinal em pH 2,0 e 4,0, respectivamente. Quanto às características estruturais do sistema aerado foi observado o fenômeno da coalescência em 28 dias de armazenamento, nos aspectos físico-químicos avaliados se destacam o teor de isoflavonas que apresentou uma redução média de 96,63% em relação ao extrato de soja em pó utilizado e a ausência de formação de moléculas de agliconas. A informação nutricional para a porção de 60g da sobremesa apresentou 91 Kcal, 1g para gorduras saturadas e fibra alimentar e 33 mg de sódio. As sobremesas do 1º ao 28º dia de armazenamento se apresentaram adequadas, segundo a legislação vigente, quanto ao aspecto sanitário e sem diferença significativa para o atributo acidez, a aceitabilidade e preferência. O custo final estimado para fabricação foi de R\$ 2,12/120g e o preço de venda no varejo foi de R\$ 4,78/120g. Embora o setor de alimentos funcionais apresente forte tendência de crescimento, no Brasil e no mundo, o desenvolvimento e a inovação destes produtos estão atrelados a escolha ideal do par linhagem probiótica e matriz alimentar, seleção esta, que demanda tempo e exaustiva investigação.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas. Cultura associada. Sobremesa com soja aerada. Resistência gastrointestinal. Matriz alimentar.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de alimentos que promovem a saúde geral e o bem estar tem sido uma prioridade de pesquisa para as indústrias alimentícias. O crescente interesse da indústria pelos alimentos funcionais tem uma razão ligada diretamente às atuais necessidades em combater problemas de saúde vividos pela população mundial (IKEDA; MORAES; MESQUITA, 2010), além do incremento nos custos com a sua manutenção (BENTO, 2009).

O declínio das taxas de nascimento e aumento da expectativa de vida em várias partes do mundo tem levado ao envelhecimento da população global (STANNER, 2009). Entretanto, o aumento desta expectativa não é acompanhado, na mesma proporção, pela qualidade de vida.

Ao longo dos últimos anos a busca por um estilo de vida mais saudável tem sido uma resposta dos indivíduos à estressada e assoberbada vida contemporânea (POZZO, 2012). Para suprir esta demanda surgiram os alimentos funcionais com vistas a unir tecnologia no desenvolvimento de novos produtos e benefícios para a saúde (DE BARCELLOS *et al.*, 2009), além de satisfazer as necessidades nutricionais básicas (FRANCO, 2006).

O potencial de crescimento mundial deste mercado tem se mostrado claramente visível nos últimos anos. Embora, em ritmo intenso de crescimento, o mercado de alimentos funcionais ainda possui amplos potenciais de estudo, visto que as pesquisas realizadas até o momento não foram exaustivas, em especial nos mercados cujo segmento é mais recente (POZZO, 2012).

O setor dos alimentos funcionais é dominado pelos produtos que influenciam a saúde intestinal e, dentro destes, estão os alimentos probióticos que representam uma grande fatia deste mercado e os alimentos prébióticos, que constituem outro grupo importante deste setor (BENTO, 2009). Os alimentos enriquecidos com substâncias com propriedades de conferir benefícios à saúde como micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos são, a cada dia, mais procurados pelos consumidores (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Entre os setores de alimentos que mais oferecem opções, de produtos funcionais, está o de laticínios com destaque para iogurtes e leites fermentados,

porém em sobremesas e bebidas fermentadas à base de extrato hidrossolúvel de soja, o estudo da adição de micro-organismos probióticos também é crescente (SHAH; ALI; RAVULA, 2000).

Os produtos funcionais, classificados como alimentos simbióticos, são considerados uma associação de micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos que tem efeito positivo sobre o hospedeiro, melhorando a sobrevivência dos micro-organismos benéficos do trato gastrointestinal (TGI), por estimular seletivamente o crescimento e/ou ativar o metabolismo de uma ou um número limitado de bactérias promotoras de saúde (GIBSON; ROBERFROID, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O consumo de probióticos e de prebióticos selecionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos, substrato-micro-organismo, ideais (STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008). Os simbióticos têm se apresentado mais efetivos que, probióticos e prebióticos de forma isolada, na melhoria da qualidade de vida de pacientes portadores de colite ulcerativa e câncer colorretal ou na microbiota intestinal (GRIMOUD *et al.*, 2010).

Produtos à base de soja têm recebido considerável atenção devido ao seu papel na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como distúrbios da menopausa, câncer, arteriosclerose e osteoporose. Entretanto, apresentam limitações comerciais decorrente do sabor desagradável e conteúdo relativamente elevado de rafinose e estaquiose, oligossacarídeos causadores de flatulência (PERES *et al.*, 2012). Para Krüger *et al.* (2008) os produtos com soja exemplificam as características que se buscam nos alimentos funcionais, pois possuem proteína em quantidade e qualidade, além de vitaminas, fibras e isoflavonas que melhoram os aspectos de funcionalidade dos alimentos.

As propriedades funcionais dos alimentos podem ser influenciadas tanto pela matriz alimentar, quanto pelo micro-organismo probiótico veiculado (RANADHERA; BAINES; ADAMS, 2010). Portanto, aliados à utilização do extrato hidrossolúvel de soja no desenvolvimento de novos produtos com características funcionais, as proteínas do soro de leite, frutanos de cadeia longa tipo inulina e de cadeia curta como oligofrutose podem ser empregados com sucesso na obtenção de matrizes alimentares para veicular cepas probióticas. Como exemplo destas

matrizes alimentares sólidas e semi-sólidas para probióticos, estão o iogurte, queijos, sorvetes, margarina, maionese, requeijão, chocolate e sobremesas.

Embora não possua uma definição técnica, sobremesa aerada é um produto com estrutura de espuma estável, formada pela incorporação de bolhas de ar a uma massa, na presença de agentes aerantes e estabilizantes (FOLEGATTI, 2001). Esta definição remete à forma usual como este tipo de sobremesa é denominado, *mousse*, palavra de origem francesa, que significa aerado ou espumoso (BURITI, 2008). As propriedades sensoriais dessa sobremesa, bem como, a sua estabilidade durante o armazenamento, dependem dessa estrutura de espuma formada e da distribuição e tamanho das células de ar (MÜLLER-FISCHER; WINDHAB, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi adicionar a cultura associada de *Pediococcus (P.) acidilactici* B14 e *Lactobacillus (Lb.) acidophilus* ATCC 4356, como cultivo potencialmente probiótico em uma sobremesa com soja aerada prebiótica, originando um produto potencialmente simbiótico. Além disso, avaliar a estabilidade microbiológica, físico-química, sensorial desta sobremesa durante o período de vida de prateleira e custo estimado de fabricação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Culturas e ingredientes

As cepas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356, utilizadas na pesquisa foram obtidas do banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba, Brasil) e foram empregadas na forma de cultura associada para o desenvolvimento da sobremesa.

Os seguintes ingredientes comerciais, de padrão alimentar, foram utilizados na produção da sobremesa com soja aerada prebiótica: extrato de soja em pó (Jasmine, Curitiba, Brasil), polpa integral pasteurizada e congelada de maracujá (De Marchi, Jundiaí, Brasil), creme de leite (20% gordura, Líder, Lobato, Brasil), sacarose (União, Coopersucar União, Limeira, Brasil), leite em pó desnatado (Sancor, Santa Fé, Argentina), inulina (Orafti HPX, Beneo-Orafti, Oreye, Bélgica), oligofrutose (Orafti P95, Beneo-Orafti), agente emulsificante (Emustab, Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil), gelatina incolor em pó (Dr. Oetker, São Paulo, Brasil), xarope de glicose de milho (Yoki, Paranavaí, Brasil), concentrado protéico de soro (80% proteína, Alibra, Marechal Cândido Rondon, Brasil) e sorbato de potássio (Biotec, Pinhais, Brasil).

Todos os reagentes empregados eram para análise e/ou padrão cromatográfico e os meios de cultivo eram de padrão microbiológico.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Manutenção das culturas

As culturas empregadas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356, foram mantidas em refrigeração ($4\pm1^{\circ}\text{C}$) durante todo o tempo da pesquisa. Para as avaliações, foram antecipadamente reativadas na concentração de 1,0% (v/v) em caldo *Man Rogosa* e *Sharpe* (MRS) (Himedia, Mumbai, Índia) a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 16 horas. Quando utilizadas na forma de cultura associada, foram cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:1, no momento do uso.

2.2.2 Método microbiológico para contagem celular

O método microbiológico empregado para determinação da viabilidade celular foi o *drop plate* (SILVA *et al.*, 2010). Consiste na deposição em quadrantes, dispostos em triplicata, de gotas de 10 μL da diluição de interesse na superfície do ágar. A população celular foi estabelecida de acordo com a EQUAÇÃO 5.1, a seguir.

$$PC = \frac{NC \times 100}{D} \quad (5.1)$$

Onde:

PC – população celular (UFC.g^{-1} ou UFC.mL^{-1});

NC – número de colônias contadas;

D – diluição em que foi realizada a contagem das colônias;

2.2.3 Preparo da cultura lática associada

A cultura lática, utilizada diretamente na sobremesa, foi obtida com extrato aquoso de soja (EAS) isento de aditivos químicos, produzido na Unidade de Produção de Alimentos da Prefeitura Municipal de Ponta Grossa (Brasil), suplementado com 0,5% (p/v) de glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha) e esterilizado a $121\pm1^{\circ}\text{C}$ por 5 min, após resfriado a temperatura ambiente ($22\pm1^{\circ}\text{C}$),

foram adicionadas as culturas de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356, na forma associada, na concentração de 5,0% (v/v) o que representa uma população celular variando de 10^{12} - 10^{10} UFC.mL⁻¹. Sendo incubada a 37±1°C por 24 horas.

2.2.4 Obtenção da sobremesa aerada

Ao veicular uma cultura associada potencialmente probiótica em uma sobremesa com soja aerada prebiótica como matriz alimentar, pode-se considerar que foi obtida uma sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica.

Os ingredientes que compuseram a formulação desta sobremesa desenvolvida estão apresentados na TABELA 5.1.

TABELA 5.1 – INGREDIENTES DA FORMULAÇÃO DA SOBREMESA COM SOJA AERADA DESENVOLVIDA

Ingredientes	Proporção (%) (p/p)
Extrato aquoso de soja	33,50
Polpa integral de maracujá	20,00
Creme de leite	18,50
Sacarose	11,00
Leite em pó desnatado	3,43
Cultura lática	3,00
Inulina	2,50
Oligofrutose	2,50
Agente emulsificante	2,00
Gelatina em pó	1,25
Xarope de milho	1,25
Concentrado protéico de soro	1,00
Sorbato de potássio	0,07

FONTE: Adaptado de BURITI, CASTRO e SAAD (2010a)

O EAS foi preparado a 6,2% (p/p) de proteína atendendo o mínimo exigido de 3,0% (p/p) para extrato de soja na forma líquida, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 268 de 22 de setembro de 2005 que trata do “Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal” (BRASIL, 2005). Para um produto receber a alegação da presença dos ingredientes prebióticos inulina ou oligofrutose, é obrigatório que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g para alimentos sólidos ou 1,5 g se o alimento for líquido, conforme a “Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas” (BRASIL, 2008). Para as sobremesas lácteas a porção para consumo sugerida é de 120g,

conforme a Resolução RDC nº359 de 23 de dezembro de 2003 que determina o “Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional” (BRASIL, 2003a). Desta forma, a porção recomendada para sobremesas lácteas foi adotada para a sobremesa aerada em estudo e as concentrações de inulina e oligofrutose utilizadas foram de 2,5% (p/p) ou 3,0g do ingrediente por 120 g de produto pronto para consumo.

O sorbato de potássio, após ser verificada a manutenção da viabilidade celular na presença deste composto, foi adicionado como agente conservante na concentração de 0,05% (p/p) de ácido sórbico, a gelatina em pó incolor foi utilizada como agente gelificante autorizado pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) como *quantum satis*, assim como, o agente emulsificante cumprindo as exigências estabelecidas pela Resolução RDC nº 388 de 05 de agosto de 1999 que trata do “Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 19-sobremesas (outras sobremesas com ou sem gelatina, com ou sem amidos, com ou sem gelificantes)” (BRASIL, 1999).

O fluxograma das etapas do processo produtivo da sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica está ilustrado na FIGURA 5.1.

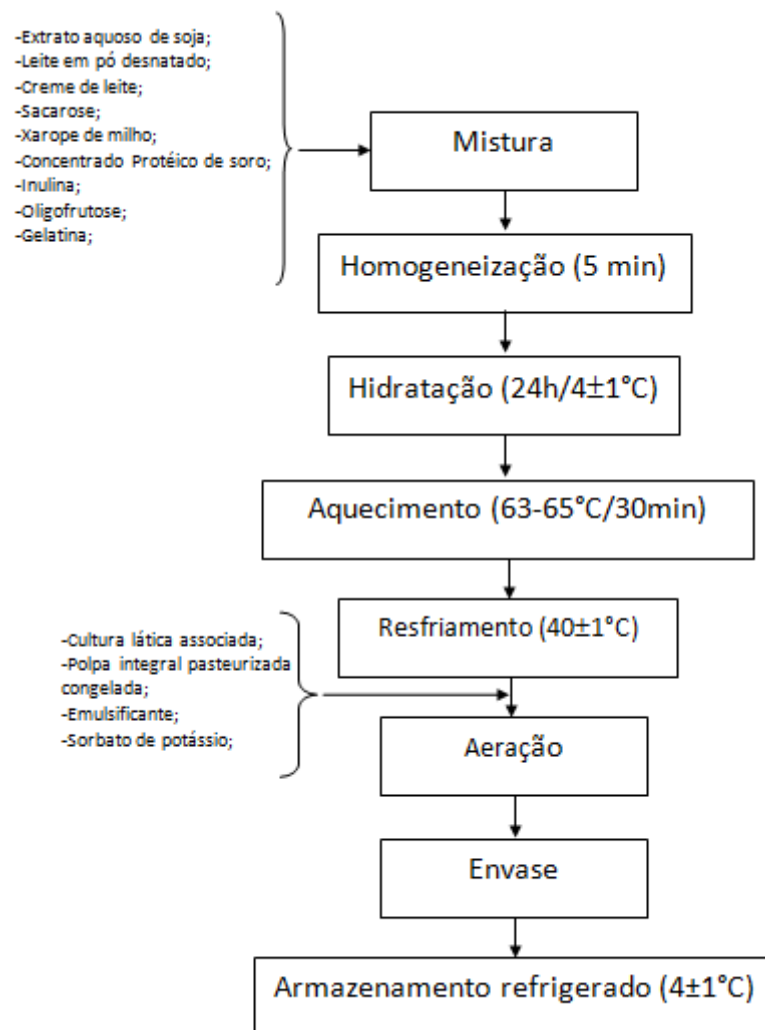


FIGURA 5.1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DA SOBREMESA COM SOJA AERADA, POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA
 FONTE: Adaptado de BURITI, CASTRO e SAAD (2010a)

O processo de obtenção consistiu na mistura dos seguintes ingredientes: EAS, creme de leite, sacarose, leite em pó desnatado, inulina, oligofrutose, agente geleificante (gelatina incolor em pó), xarope de milho e concentrado protéico de soro (CPS). Esta mistura depois de homogeneizada por 5 min em agitador (*mixer*) doméstico (Black & Decker, SB 40, Brasil) foi maturada, para a máxima hidratação dos sólidos, durante 24 h a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ e na sequência foi realizada pasteurização lenta a $63-65^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$ e resfriada até $40\pm 1^{\circ}\text{C}$. A cultura láctica foi adicionada com o restante dos componentes da formulação como polpa integral pasteurizada congelada de maracujá, agente emulsificante e sorbato de potássio, sendo em seguida realizada a etapa de aeração em batedeira doméstica (Arno, Planetária, Brasil) com aproximadamente 500rpm durante 8 minutos. O envase foi efetuado manualmente

em embalagens de polipropileno (PP) de 100 mL, na quantidade de 40 gramas, e seguido de armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

2.2.5 Avaliação das características da sobremesa

As características microbiológicas e físico-químicas da sobremesa foram avaliadas nos períodos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado, exceto os parâmetros físicos que foram avaliados logo após a obtenção da sobremesa (tempo 0) e nutricionais com 1 dia de armazenamento. A avaliação sensorial e a captura das imagens de microscopia óptica e eletrônica de varredura foram realizadas para as amostras de 1 e 28 dias de conservação.

2.2.5.1 Características físicas

Na mistura, obtida após a adição de todos os ingredientes, foi determinada a densidade inicial (sem gases). Após o processo de batimento e aeração foram avaliadas as medidas físicas do sistema aerado como densidade, volume específico e teor de ar como demonstram as EQUAÇÕES 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5 (FOLEGATTI, 2001) e o *overrun* apresentado na EQUAÇÃO 5.6 (ANTUNES, 2003).

$$\rho_0 = \frac{m_0}{V_0} \quad (5.2)$$

$$\rho_{sa} = \frac{m_{sa}}{V_{sa}} \quad (5.3)$$

$$V_{esp.} = \frac{1}{\rho_{sa}} \quad (5.4)$$

$$\alpha = \left(\frac{1 - \rho_{sa}}{\rho_0} \right) \times 100 \quad (5.5)$$

$$Overrun = \left(\frac{V_{sa} - V_0}{V_0} \right) \times 100 \quad (5.6)$$

Onde:

ρ_0 – densidade inicial (g.cm^{-3});

m_0 – massa inicial (produto não batido) (g);

V_0 - volume inicial (produto não batido) (cm^3);

ρ_{sa} – densidade do sistema aerado (g.cm^{-3});

m_{sa} – massa do sistema aerado (produto batido) (g);

V_{sa} – volume do sistema aerado (produto batido) (cm^3);

$V_{esp.}$ – volume específico do sistema aerado ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$);

α – conteúdo de ar incorporado (%);

Overrun – capacidade de formação de espuma (%);

2.2.5.2. Características microscópicas

As amostras de 1 e 28 dias foram preparadas para as análises microscópicas por liofilização (Liobrás, Liotop/L101, Brasil) durante 24h à $-55\pm 1^\circ\text{C}$ sob vácuo de 85-90 μHg , sendo liofilizadas nas embalagens o que permitiu obter a estrutura intacta da sobremesa aerada.

Na microscopia óptica as amostras foram laminadas na espessura de 60-120 μm em micrótomo (Leica, RM2025, Estados Unidos) e visualizadas sob luz refletida em campo escuro em microscópio óptico (Olympus, BX51, Brasil) utilizando programa de captura *Image - Pro Plus* versão 5.1 e acoplado à câmera digital (Olympus, QColor3) com 3MPixel de resolução.

Para a microscopia eletrônica de varredura, os corpos de prova foram metalizados com ouro usando IC-50 *Ion Coater* (Shimadzu, Japão) por 10 minutos. As imagens foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura (Super Scan, SSX 550, Shimadzu).

2.2.5.3 Características microbiológicas

2.2.5.3.1 Viabilidade celular da cultura associada

A determinação da viabilidade celular da cultura associada de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 na sobremesa, durante o período de armazenamento refrigerado, foi realizada conforme representado pela FIGURA 5.2.

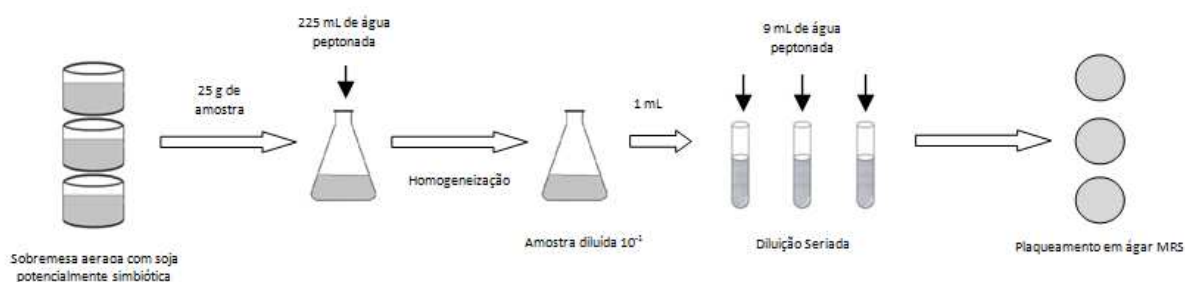


FIGURA 5.2 ESQUEMA ILUSTRADO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR NA SOBREMESA

Uma porção de 25g da sobremesa foi coletada assepticamente, diluída em 225 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) de peptona bacteriológica (Himedia) e submetida à homogeneização por 1 min, utilizando sacos estéreis (Interscience, Ontatio, Canada) em triturador de tecidos e misturador *Stomacher* (MARCONI, MA 440, Brasil). O material obtido foi submetido à diluição seriada em água peptonada a 0,1% (p/v), seguido de plaqueamento em ágar MRS pelo método *drop plate* e incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas .

2.2.5.3.2 Resistência ao sistema gastrointestinal

A viabilidade celular da cultura associada, na sobremesa, frente às condições simuladas, *in vitro*, do sistema gastrointestinal (SGI) foi avaliada conforme adaptação do protocolo proposto por Fernández, Boris e Barbés (2003). O suco gástrico (SG) foi simulado com cloreto de sódio a 125 mM, cloreto de potássio (Biotec, Pinhais, Brasil) a 7 mM, bicarbonato de sódio a 45 mM, 0,3% (p/v) de pepsina porcina (Nuclear, Diadema, Brasil). Utilizado em pH 2,0 e 4,0, sendo

corrigido com ácido clorídrico concentrado e esterilizado em filtro a 0,45 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech, Bohemia, Estados Unidos). O suco intestinal (SI) foi formulado com 0,5% (p/v) de cloreto de sódio, 0,1% (p/v) pancreatina porcina (350 FIP-U.g⁻¹ de protease, 6000 FIP-U.g⁻¹ de lipase, 7500 FIP-U.g⁻¹ de amilase – Merck), 0,15% (p/v) de bile bovina (Himedia) em pH 8,0, corrigido com solução a 5M de hidróxido de sódio, posteriormente esterilizado em microfiltro a 0,45 µm de poro.

A resistência da cultura associada foi avaliada nas condições de pH 2,0 e 4,0 para o SG, nos intervalos de 90 min (T₁) e 180 min (T₂). Os tempos de 270 min (T₃) e 360 min (T₄) deram continuidade ao experimento na presença de SI. A FIGURA 5.3 apresenta um esquema ilustrado do protocolo utilizado para a avaliação *in vitro* da resistência ao SGI.

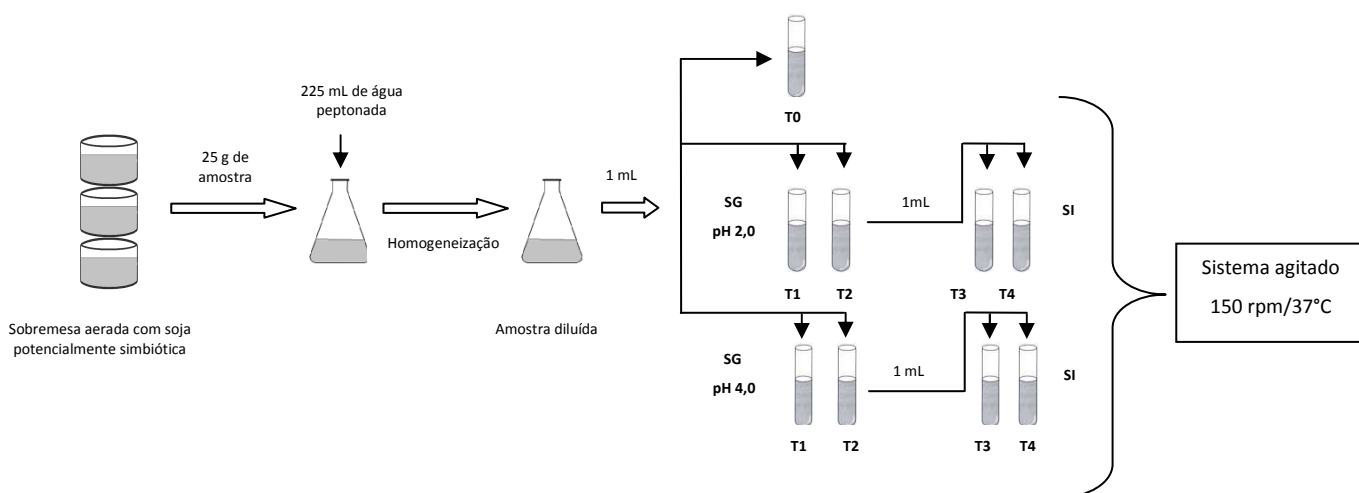


FIGURA 5.3 – ESQUEMA ILUSTRADO DO PROTOCOLO UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA AO SISTEMA GASTROINTESTINAL

FONTE: Adaptado de FERNÁNDEZ, BORIS e BARBÉS (2003)

NOTA: T₁ - tempo de incubação 90 min em SG; T₂ - tempo de incubação de 180 min em SG; T₃- tempo de incubação de 270 min (180 min em SG + 90 min em SI); T₄ - tempo de incubação 360 min (180 min em SG + 180 min em SI);

Uma porção de 25g da sobremesa foi coletada assepticamente, diluída em 225 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) de peptona bacteriológica e submetida à homogeneização por 1 min, utilizando sacos estéreis em triturador de tecidos e misturador *Stomacher*. O experimento controle foi realizado no tempo T₀ pela diluição seriada em água peptonada a 0,1% (p/v), da sobremesa anteriormente diluída e homogeneizada. Seguido de plaqueamento em ágar MRS pelo método *drop plate* e incubação a 37±1°C por 72 horas. Partindo ainda, da sobremesa anteriormente diluída e homogeneizada foram coletadas quatro alíquotas de 1 mL e

adicionadas em tubos contendo 9 mL de SG em pH 2,0 e 9 mL de SG em pH 4,0, sendo incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ em agitador orbital a 150 rpm. Após 90 e 180 min de incubação, os tubos denominados de T_1 e T_2 , respectivamente, foram retirados e o conteúdo diluído, plaqueado e incubado conforme descrito anteriormente. Do conteúdo celular do tempo T_2 ainda foram coletadas, após agitação, alíquotas de 1mL tanto do SG em pH 2,0, quanto do SG em pH 4,0 e adicionadas em tubos contendo 9 mL de SI. Estes tubos foram incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 150 rpm, permanecendo mais 90 (T_3) e 180 min (T_4) e em seguida, submetidos à diluição e plaqueamento. Desta forma, o SI do tempo T_3 totalizou 270 min de ensaio (180 min do tempo T_2 + 90 min do tempo T_3) e o SI do tempo T_4 finalizou a avaliação com 360 minutos (180 min do tempo T_2 + 180 min do tempo T_4).

2.2.5.3.3 Características sanitárias

Para a avaliação do aspecto sanitário da sobremesa foi consultado o item “Produtos a base de soja” e como o subitem mais adequado as características do produto “Bebidas a base de extrato de soja, aromatizada ou não, desengordurada ou não, refrigerada e similares; extrato desidratado e proteína texturizada de soja, desengordurado ou não e similares” da Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 que define o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos” (BRASIL, 2001). Portanto, conforme exigência da legislação acima mencionada, para as sobremesas conservadas no período de 1 e 28 dias foram determinados coliformes a 45°C , *Salmonella* sp. e *Bacillus cereus* (SILVA *et al.*, 2010) (laudos Anexo 1 e Anexo 2).

2.2.5.4 Características químicas

2.2.5.4.1 Características físico-químicas

A firmeza foi determinada em amostras, da sobremesa, de 40g contidas em embalagens plásticas individuais, mantidas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1, 7, 14, 21 e 28 dias. O

analisador de textura (Brookfield, CT3, Estados Unidos) foi empregado, operando com cilindro de acrílico (*probe*) com 25mm de diâmetro (TA11-1000) e distância e velocidade de compressão de 20mm e 1mm/s, respectivamente, em programa *Texture Pro CT for Windows*, versão 1.2 (Brookfield).

A atividade de água (A_w) a $20\pm1^\circ\text{C}$ foi medida em analisador *Aqua Lab* (Decagon Devices, 4TE, Estados Unidos).

Os valores de pH das sobremesas, foram medidos usando pHmetro digital (Tecnal, TEC-2mp, Brasil).

A acidez total foi determinada por titulometria de acordo com IAL (2008).

2.2.5.4.2 Características cromáticas

A cor da sobremesa nos tempos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias, foi medida em colorímetro (Hunter Lab, Ultra Scan Pro, Estados Unidos), utilizando escala $L^* a^* b^*$, recomendada pela *Commision Internationale de L'Eclairage* (CIE). O equipamento foi calibrado com fundo branco (cerâmica) obtendo os valores de $L = 86,22$, $a^* = -0,91$ e $b^* = -1,38$. A avaliação da coloração foi feita em três pontos distintos da superfície da amostra de sobremesa, devidamente embalada em filme de policloreto de polivinila (PVC). A interpretação dos resultados ocorreu utilizando as EQUAÇÕES 5.7, 5.8 e 5.9 (GRANATO, 2009).

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (5.7)$$

Onde:

C^* = Croma (grau de concentração ou pureza de uma cor);

a^* = coloração na região do vermelho(+) ao verde(-);

b^* = coloração no intervalo do amarelo (+) ao azul (-);

$$h^* = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (5.8)$$

Onde:

H^* = ângulo *Hue* (ângulo formado entre a^* e b^* indicando a tonalidade da cor);

$$\Delta E_{ab}^* = \left((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right)^{1/2} \quad (5.9)$$

Onde:

ΔE_{ab}^* - variação da cor da amostra em determinado intervalo de tempo;

ΔL^* - variação da luminosidade (quantidade de luz que é refletida de uma cor);

Δa^* - variação de a^* ;

Δb^* - variação de b^* ;

2.2.5.4.3 Características da composição de isoflavonas

Para a determinação da concentração de isoflavonas totais, as amostras de sobremesa foram previamente liofilizadas por 24h a $-55 \pm 1^\circ\text{C}$ sob regime de vácuo de 85-90µHg. As isoflavonas foram extraídas, das amostras previamente desengorduradas, com solvente extrator composto por água, etanol absoluto (Merck) e acetonitrila anidra (99,9%) (Sigma-Aldrich) (1:1:1, v/v/v) durante 10 min a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho de ultrassom (Quimis, 335D, Brasil) (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003). Na sequência foram centrifugadas a 7.200xg por 15 minutos (Fischer Scientific, micro 14, Inglaterra) e filtradas em microfiltros Millex-LH a 0,20µm de poro (Millipore, Billerica, Estados Unidos). As amostras separadas foram quantificadas utilizando cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (CLUAE) (Waters, Acquity, Estados Unidos) equipado com coluna de fase reversa de 2,1mm x 50,0mm e empacotada com resina C18 (partículas de 1,7µm, Waters, Acquity, UPLC BEH C18) e detector de arranjo de diodos (Waters). A cromatografia CLUAE foi operada em sistema de gradiente binário, com fase inicial de 90% de água acidificada com ácido acético glacial (Sigma-Aldrich) (pH 3,0) e 10% de acetonitrila, sendo que em 8 min de eluição foi atingida a proporção de 100% de acetonitrila, retornando as condições iniciais em 9 minutos. A vazão da fase móvel foi de 0,6 mL.min⁻¹ e a temperatura

constante de $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. O detector foi ajustado para o comprimento de onda de 260nm. A identificação das isoflavonas foi realizada por comparação com curvas individuais de padrão cromatográfico de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína, acetil-daidzina, acetil-glicitina e acetil-genistina (Sigma-Aldrich). As formas malonilglicosídicas foram calculadas a partir das curvas dos padrões dos seus correspondentes β -glicosídeos utilizando a similaridade do coeficiente de extinção (COWARD *et al.*, 1998). A quantificação foi feita por padronização externa, utilizando como referência as curvas dos padrões de isoflavonas (cromatogramas das amostras de 1, 7, 14, 21 e 28 dias nos Apêndices 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

2.2.5.5 Rotulagem nutricional

Para a construção da tabela de informação nutricional a composição centesimal da amostra de sobremesa com 1 dia de armazenamento refrigerado, foi determinada pelo Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (laudo no Anexo 3), sendo realizadas as avaliações de: umidade, cinzas, proteína total, gordura total, fibra alimentar e os minerais sódio e cálcio.

A umidade foi analisada por perda termogravimétrica a $105\pm 1^{\circ}\text{C}$ até massa constante. Cinzas, obtidas após queima da matéria orgânica e incineração por mufla a $550\pm 1^{\circ}\text{C}$. A proteína total foi calculada pela multiplicação do fator 6,25 pelo teor de nitrogênio total determinado pelo método de micro *Kjeldhal* e a gordura total determinada pelo método de *Soxhlet*, a matéria graxa foi extraída utilizando éter de petróleo (Biotec) como solvente orgânico (IAL, 2008). A fibra alimentar foi determinada utilizando kit enzimático K-TDFR 03/2009 (Megazyme, Wicklow, Irlanda) seguindo metodologia oficial para fibra dietética total. Os minerais sódio e cálcio foram determinados seguindo protocolo oficial (IAL, 2008). O teor de fósforo foi obtido por via seca (SILVA, 1981).

2.2.5.6 Características sensoriais

Na avaliação sensorial foram empregadas as amostras de 1 e 28 dias de conservação, sendo pesquisadas quanto a diferença de acidez e preferência por teste de comparação pareada. O teste de aceitabilidade foi realizado utilizando escala hedônica de 7 pontos, variando de desgostei muitíssimo a gostei muitíssimo (FERREIRA *et al.*, 2000) (ficha de avaliação sensorial no Apêndice 6). Os testes foram conduzidos em cabines individuais sob luz branca fluorescente. Aproximadamente 20g de cada amostra em embalagens plásticas individuais codificadas, a temperatura de $4\pm1^{\circ}\text{C}$, foram avaliadas por 100 julgadores previamente recrutados (ficha de recrutamento no Apêndice 7). A realização deste estudo foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP/UEPG) com parecer nº128/2011 (Anexo 4), sendo obtido consentimento de todos os participantes (termo de consentimento livre e esclarecido no Apêndice 8).

2.2.5.7 Estimativa de custo

A metodologia empregada para estimar o custo do produto final foi baseada em planilha utilizada pelo setor de desenvolvimento de produtos de uma indústria de laticínios da região de Ponta Grossa.

O cálculo para o valor total e o valor por unidade de produto referente a cada matéria-prima estão apresentados nas EQUAÇÕES 5.10 e 5.11.

$$V_T = Q_T \times V_U \quad (5.10)$$

$$V_{UP} = \frac{Q_U \times V_T}{Q_{PF}} \quad (5.11)$$

Onde:

V_T – valor total da matéria-prima (R\$);

Q_T – quantidade teórica da matéria-prima (Kg ou L);

V_U – valor unitário da matéria-prima (R\$.Kg⁻¹ ou R\$.L⁻¹);

V_{UP} – valor por unidade de produto (R\$.Kg⁻¹ ou R\$. L⁻¹);

Q_U – quantidade unitária do produto final (R\$ ou L);

Q_{PF} – quantidade que se deseja produzir do produto final (Kg ou L);

2.2.6 Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos pela média das triplicatas e respectivos desvios padrão. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) usando o pós-teste de *Tukey*, com erro de $p < 0,05$. O programa SASM-Agri, versão 8.2 (CANTERI *et al.*, 2001) foi utilizado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pela Resolução RDC nº 91 de 18 de outubro de 2000, que trata do “Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimento com soja” define que alimento com soja é o produto cuja principal fonte de proteínas é proveniente da soja (BRASIL, 2000). Para a sobremesa aerada potencialmente simbiótica o teor total de proteínas é representado por proteínas de origem vegetal (soja) e animal (leite e gelatina), sendo 45% provenientes da soja e o restante dividido em 36% de proteínas do leite e 19% de proteínas da gelatina. Portanto, a sobremesa desenvolvida pode ser considerada sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica com sabor maracujá.

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Os sistemas aerados, ou espumas, são termodinamicamente instáveis, em que as bolhas presentes precisam ser estabilizadas. Esta estabilidade está relacionada com a reologia do sistema e é conferida por diferentes mecanismos como os agentes superfície-ativos, característica conferida, entre outras substâncias, às proteínas e emulsificantes, que são capazes de reduzir a tensão superficial na interface, diminuindo a tendência termodinâmica de minimização da área interfacial (ZUÑIGA; AGUILERA, 2008).

A estabilidade de uma espuma pode ser definida como a habilidade em manter constante algumas de suas propriedades por um tempo determinado (ex. volume da espuma, tamanho da bolha e conteúdo de líquido) (MARINOVA *et al.*, 2009).

Os diversos agentes aerantes apresentam propriedades de incorporação de ar e formação de espuma diferente e, conseqüentemente, produzem distintos volumes de espuma, com características físicas (volume de ar incorporado, tamanho das bolhas de ar e firmeza) e estabilidade variável (FOLEGATTI, 2001).

A densidade sem gases, ou seja, da mistura adicionada de todos os ingredientes da formulação foi de 1,10 g.cm⁻³. Após o processo de aeração o valor

do mesmo material, transformado em espuma foi de $0,41 \text{ g.cm}^{-3}$, sendo determinados o volume específico de $2,44 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$, conteúdo de ar incorporado de 53,64% e o *overrun* obtido de 162,67%. Campbell e Mougeot (1999) estabeleceram valores típicos de parâmetros relacionados ao teor de ar para alimentos aerados, e os valores obtidos para sistema aerado deste estudo se enquadram na classe de creme batido com valores entre $0,40\text{-}0,50 \text{ g.cm}^{-3}$ para densidade, $1,01 \text{ g.cm}^{-3}$ para densidade sem gases, $1,7\text{-}2,5 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ de volume específico, 40-60% de teor de ar incorporado e 70-150% de *overrun*.

Ohata *et al.* (2005) adotaram o conceito de *overrun* como a capacidade de formação de espuma. Entretanto, o *overrun* também pode ser conceituado como a capacidade de incorporação de ar, característica esta inerente a composição da mistura, ao mecanismo e parâmetros utilizados para a obtenção da espuma. Como afirmam Marinova *et al.* (2009) que o processo de formação da espuma depende tanto das propriedades das substâncias estabilizantes usadas, quanto do processo empregado para a obtenção da espuma.

As características macroscópicas (estabilidade e propriedades físicas) de espumas são dependentes, em parte, da geometria e alterações dinâmicas das bolhas (unidades microscópicas estruturais). As propriedades físicas da fase líquida (viscosidade e densidade), fase gasosa (densidade, solubilidade e difusividade) e interface (tensão interfacial e reologia) são críticas para a formação e estabilidade de bolhas em espumas (YANG; FOEGEDING, 2011).

3.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

A sobremesa aerada ou *mousse* é um produto que apresenta uma estrutura complexa, que envolve a formação de uma espuma que é um sistema de duas fases constituído de bolhas de gás envolvidas por uma fase lamelar líquida contínua. Devido a sua grande área interfacial gás-líquido, uma espuma é fundamentalmente instável, e sua estabilidade depende das propriedades mecânicas da lamela. Proteínas e emulsificantes são agentes superfície-ativos e têm como objetivo diminuir a tendência termodinâmica da minimização da área interfacial, pois as

bolhas podem se romper ou coalescer com a diminuição da espessura desta interface (FOLEGATTI, 2001).

As imagens obtidas por microscopia óptica, apresentadas na FIGURA 5.4, permitem a observação da forma física da sobremesa aerada, porém com pouca nitidez quanto à coalescência ocorrida na estrutura das amostras analisadas. Porém, nas imagens apresentadas pela FIGURA 5.5, a heterogeneidade presente na dimensão das bolhas pode ser verificada com maior precisão.

A variação no tamanho das bolhas pode ser decorrente do método de incorporação de ar utilizado para a obtenção da sobremesa aerada, que foi o processo mecânico de batimento em equipamento doméstico. Durante a formação da espuma (batimento), o ar é confinado dentro de um líquido viscoso e forma grandes bolhas, as quais são alongadas e divididas em pequenas bolhas por ação mecânica, outros fenômenos como coalescência e drenagem também podem influenciar no tamanho final das bolhas, porém a ação mecânica (fluxo laminar ou turbulento) é o fator mais relevante (YANG; FOEGEDING, 2011).

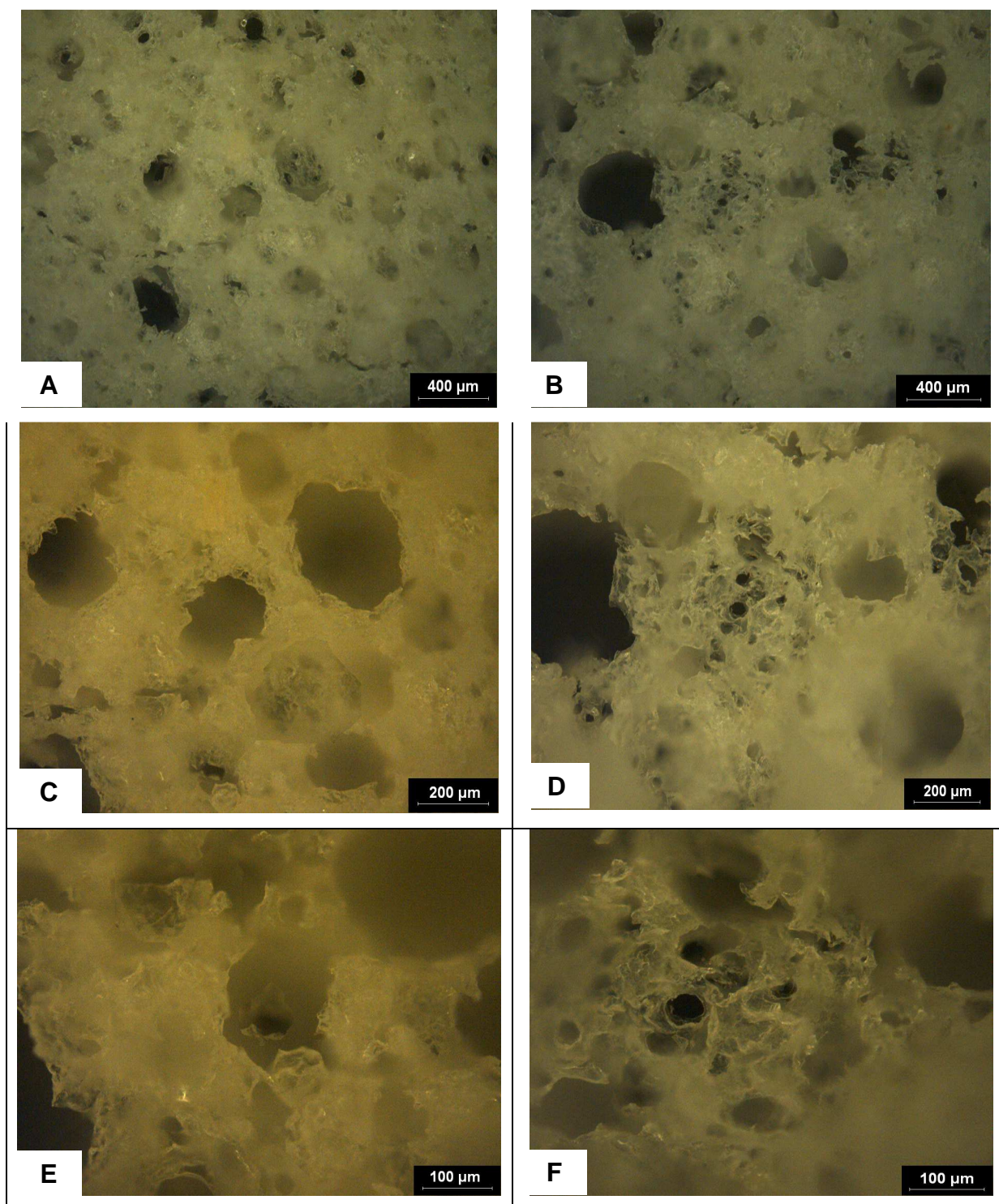


FIGURA 5.4 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA, SOB CAMPO ESCURO, DA SOBREMESA AERADA COM 1 E 28 DIAS DE REFRIGERAÇÃO

NOTA: A) Amostra de 1 dia de armazenamento com ampliação de 50x; B) Amostra de 28 dias de armazenamento com ampliação de 50x; C) Amostra de 1 dia de armazenamento com ampliação de 100x; D) Amostra de 28 dias de armazenamento com ampliação de 100x; E) Amostra de 1 dia de armazenamento com ampliação de 200x; F) Amostra de 28 dias de armazenamento com ampliação de 200x;

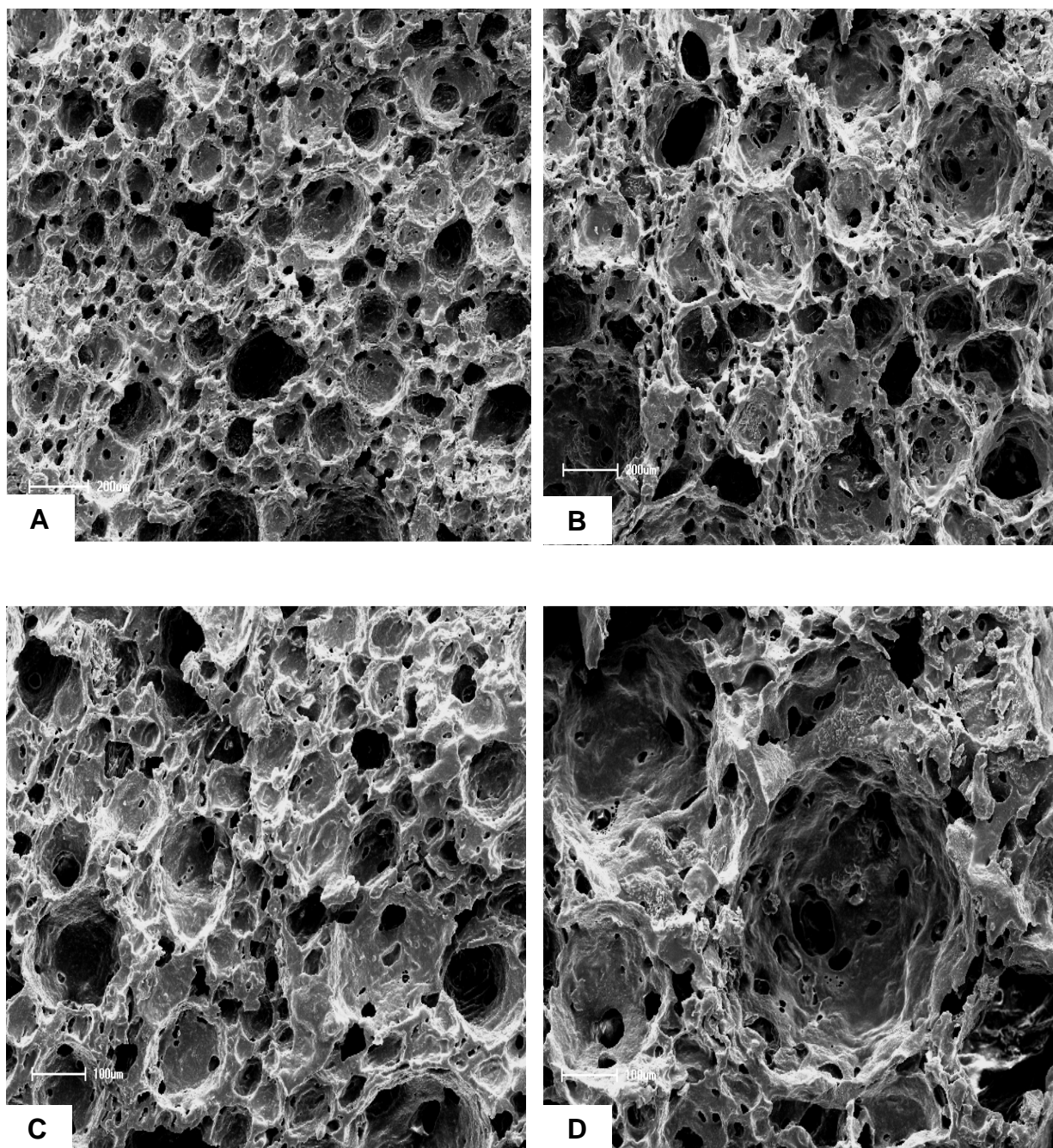


FIGURA 5.5 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ESTRUTURA DA SOBREMESA AERADA, COM 1 E 28 DIAS DE CONSERVAÇÃO REFRIGERADA

NOTA: A) Amostra de 1 dia de armazenamento com ampliação de 50x; B) Amostra de 28 dias de armazenamento com ampliação de 50x; C) Amostra de 1 dia de armazenamento com ampliação de 100x; D) Amostra de 28 dias de armazenamento com ampliação de 100x.

As amostras da sobremesa aerada de 1 e 28 dias, quando ampliadas em 50 e 100x (FIGURA 5.4) e comparadas, apresentaram características estruturais que demonstram a ocorrência, ao longo do tempo, da ruptura das bolhas de ar. A coalescência das bolhas representa um processo de diluição e ruptura das películas finas entre bolhas vizinhas, ou entre a bolha e o ambiente (MARINOVA *et al.*, 2009).

Para Wilde e Sarker (1999) um sistema misto de surfactantes e proteínas pode ser instável à medida que o surfactante dilui a proteína e evita sua interligação, enquanto as proteínas interferem na rápida difusão superficial do emulsificante. Esta afirmação pode explicar a coalescência ocorrida na estrutura das amostras de sobremesa ao longo do tempo de armazenamento refrigerado.

Um fator relevante é a condição de pH do sistema aerado, considerando que a estabilidade da espuma está diretamente relacionada com as proteínas e suas formas estruturais, pequenas variações de pH no meio podem influenciar a funcionalidade de tais moléculas, conseqüentemente comprometendo a estabilidade de espumas. Na sobremesa aerada, foram observadas alterações de pH (TABELA 5.3) ao longo do tempo de armazenamento, assim como mudanças quanto a estabilidade do sistema aerado.

A avaliação das características estruturais de sobremesas aeradas deve ser considerada um pré-requisito para a qualidade global deste produto, pois se o fenômeno da coalescência promove o aumento do tamanho das bolhas pode ocorrer, com um tempo prolongado de armazenamento, um colapso na estrutura aerada comprometendo a qualidade final deste alimento.

3.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

3.3.1 Viabilidade celular da cultura associada

Alimentos probióticos são definidos como produtos alimentícios que contêm micro-organismos probióticos viáveis, em população suficiente, incorporados em uma matriz adequada (CRUZ *et al.*, 2009). As populações de 10^6 - 10^7 UFC. g⁻¹ no produto final são estabelecidas, por alguns autores, como quantidades terapêuticas de culturas probióticas em alimentos processados (TALWALKAR *et al.*, 2004).

Atingindo 10^8 - 10^9 UFC pelo consumo diário de 100g ou 100mL do alimento probiótico (JAYAMANNE; ADAMS, 2006).

Como pode ser observado no GRÁFICO 5.1, durante os 28 dias analisados como vida de prateleira da sobremesa aerada a viabilidade celular variou, com diferença significativa ($p < 0,05$), de 9,82 (1 dia) a 9,26 (28 dias) $\log \text{UFC} \cdot 120\text{g}^{-1}$, no entanto não apresentou diferença significativa entre os tempos 7, 14 e 21 dias. Os resultados obtidos, ao longo do período avaliado, estão de acordo com o preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2008) que determina que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC (8-9 $\log \text{UFC}$) na recomendação diária do produto pronto para consumo conforme indicação do fabricante.

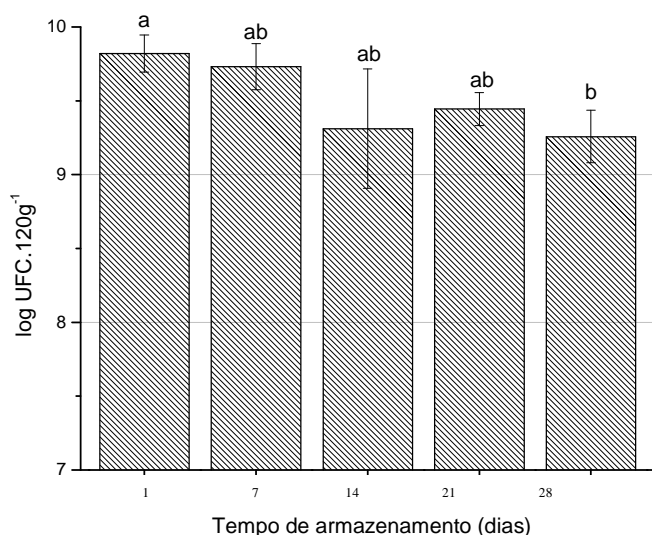


GRÁFICO 5.1 – VIABILIDADE DA CULTURA ASSOCIADA NA SOBREMESA, DURANTE 28 DIAS SOB TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO

NOTA: Letras diferentes entre os tempos de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey).

Inúmeros fatores na matriz alimentar podem influenciar a viabilidade probiótica, incluindo acidez, produção de peróxido de hidrogênio, conteúdo de oxigênio, concentração de açúcares (*stress* osmótico), A_w , metabólitos e temperatura de armazenamento (CHAMPAGNE *et al.*, 2011), conteúdo de gordura, a concentração e o tipo de proteínas (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). A inulina, ingrediente alimentar com característica prebiótica, foi descrita como uma substância que pode ajudar na sobrevivência de micro-organismos probióticos

durante o processamento e armazenamento de produtos lácteos (CAPELA; HAY; SHAH, 2006; BURITI *et al.*, 2007). Outro ingrediente que pode exercer efeito protetor sobre os probióticos durante o armazenamento é o CPS, devido a sua composição rica em compostos nitrogenados e capacidade tamponante resultando em valores mais elevados de pH (BURITI, CASTRO, SAAD, 2010a).

3.3.2 Resistência ao sistema gastrointestinal

O estudo da tolerância às condições gastrointestinais conduzidas com bactérias probióticas incorporadas no produto final parece ser útil na seleção de uma matriz alimentar adequada que contribua para a sobrevivência do probiótico no TGI (SCHILLINGER; GUIGAS; HOLZAPFEL, 2005).

Na permanência do SG em pH 2,0, como apresenta o GRÁFICO 5.2, todas as amostras de sobremesa apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos primeiros 90 min de simulação, ocorrendo também alterações significativas ($p < 0,05$) para as amostras de 7, 14 e 21 dias com 180 min de ensaio. Após 180 min, tempo total da etapa gástrica, foi observada uma redução de 2,54 e 3,18 ciclos logarítmicos para as amostras de 1 e 28 dias, respectivamente. Buriti, Castro e Saad (2010a) ao submeter uma *mousse* simbiótica de goiaba com *Lb. acidophilus* La-5 sob condições simuladas do SGI em pH próximo a 2,0, obtiveram uma redução de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos na sobremesa com 1 dia de armazenamento refrigerado.

Quando as sobremesas foram colocadas em contato com o SI, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para as amostras de 1 e 7 dias, não foi verificada redução da população bacteriana, em ciclos logarítmicos, para esta etapa.

Quanto à influência do tempo de armazenamento sobre a resistência ao SGI foi observado um padrão, exceto para o tempo de 360 min, na resposta para as sobremesas de 1 e 28 dias. A amostra do primeiro dia apresentou maior viabilidade, ou seja, foi mais resistente quando comparada com a do último dia.

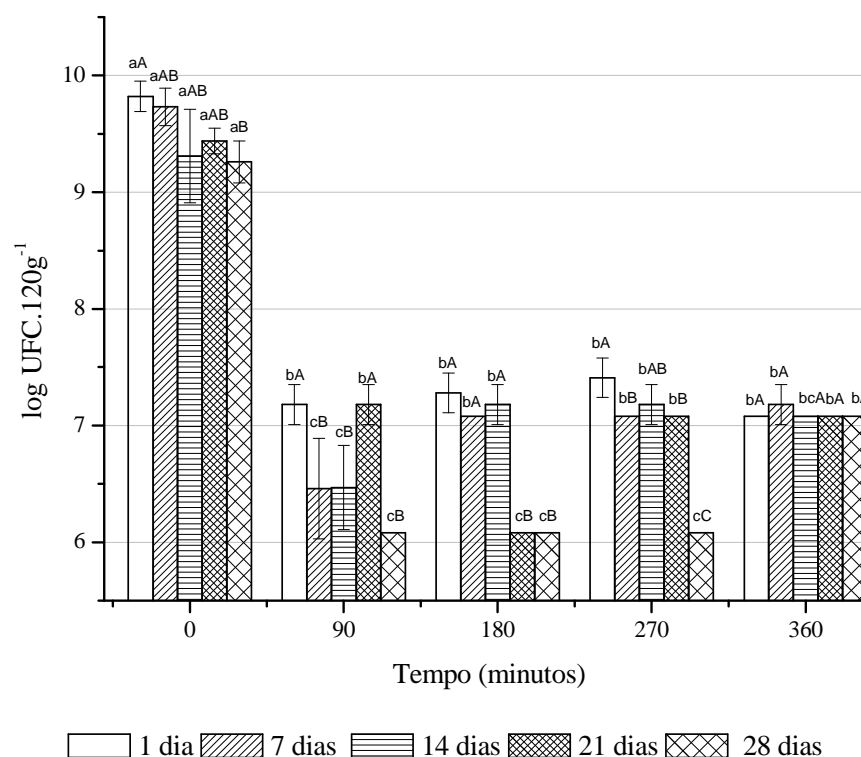


GRÁFICO 5.2 – VIABILIDADE CELULAR DA CULTURA ASSOCIADA NA SOBREMESA, FRENTE AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO EM CONDIÇÃO DE pH 2,0
 NOTA: Letras minúsculas diferentes entre os tempos da simulação no SGI e letras maiúsculas diferentes entre os tempos de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey).

De acordo com Champagne *et al.* (2011) um produto que contém organismos probióticos devem conter um número de células viáveis que apresentam efeito benéfico, variando geralmente entre 10^6 - 10^8 UFC.g⁻¹. Portanto, a população obtida após a passagem no TGI ainda se enquadra nos requisitos estabelecidos pela literatura para produtos probióticos. Ao final da passagem pelo SGI, foram obtidas nas sobremesas durante o tempo de estocagem, populações que variaram de $1,20 \times 10^7$ a $1,60 \times 10^7$ UFC. 120g⁻¹.

Quando avaliada a resistência da cultura associada de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 para o trânsito em todo o SGI foi observada uma redução de 35,48, 33,25, 32,16, 32,16 e 30,56% na população celular (log UFC.g⁻¹) para as sobremesas de 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente. Esta cultura associada quando avaliada de forma isolada e sem matriz alimentar apresentou, para as mesmas condições de simulação (Cap. IV), uma redução de 42,72% na população celular. Isto indica que a matriz alimentar promoveu um

aumento médio na sobrevivência das bactérias em 10,00% para as condições testadas.

Quando as sobremesas foram submetidas a condições gástricas com pH 4,0, como apresentado no GRÁFICO 5.3, a viabilidade da cultura associada foi superior quando comparada ao ambiente gástrico em pH 2,0 (GRÁFICO 5.2). Para os 90 min iniciais da avaliação frente ao SG em pH 4,0, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) somente para as amostras de 1 e 7 dias de armazenamento. No tempo de 180 min no SG, as sobremesas de 14, 21 e 28 dias não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto à viabilidade celular. Para estas condições não foi observada a redução de 1 ciclo logarítmico completo em todas as amostras analisadas.

A presença do suco entérico demonstrou que as amostras dos dias 14, 21 e 28 permaneceram sem apresentar diferença significativa ($p < 0,05$), resultado não observado para as amostras de 1 e 7 dias.

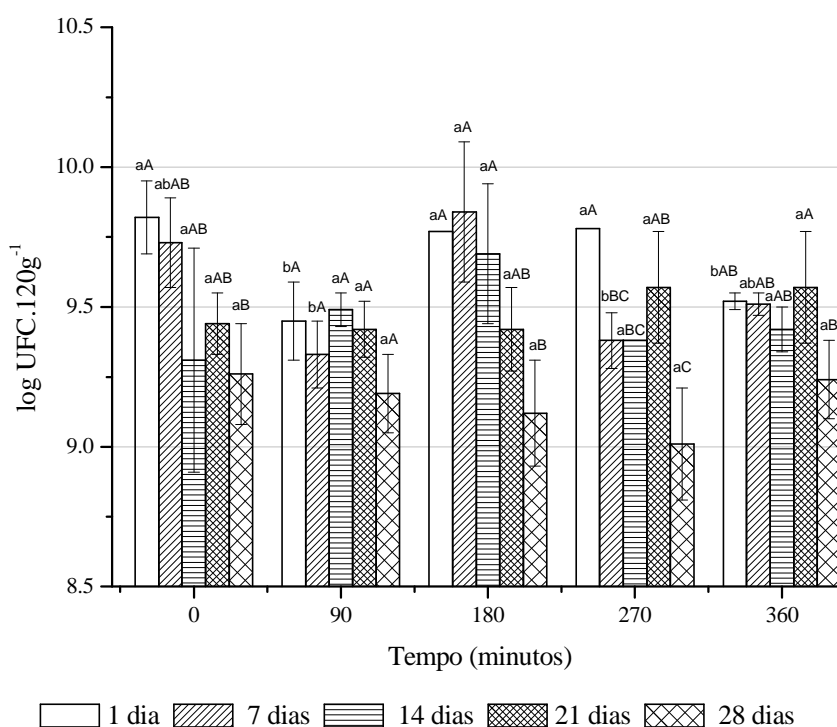


GRÁFICO 5.3 – VIABILIDADE CELULAR DA CULTURA ASSOCIADA NA SOBREMESA, FRENTE AO SISTEMA GASTROINTESTINAL SIMULADO EM CONDIÇÃO DE pH 4,0
 NOTA: Letras minúsculas diferentes entre os tempos da simulação no SGI e letras maiúsculas diferentes entre os tempos de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey).

Após a simulação da passagem no TGI, foram obtidas as populações de $3,32 \times 10^9$; $3,24 \times 10^9$; $2,68 \times 10^9$; $4,00 \times 10^9$; $1,80 \times 10^9$ UFC.120g⁻¹ para as sobremesas de 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente.

Quando uma bactéria probiótica é veiculada por um alimento, a capacidade tamponante da matriz alimentar representa o fator principal que afeta o pH do estômago e pode aumentar a tolerância gástrica (MEIRA *et al.*, 2012).

A resistência da cultura associada para todo o SGI apresentou uma redução de 4,00, 3,13, 0,27, 0,00 e 0,28% na população celular (log UFC.g⁻¹) para as sobremesas de 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente. A cultura associada de *P. acidilactici* B14 e *Lb. acidophilus* ATCC 4356 quando avaliada sem a matriz alimentar apresentou uma redução de 7,60% na população bacteriana. Representando um aumento médio 5,68% na viabilidade celular, assim como, na simulação do SGI em pH 2,0, a matriz alimentar utilizada promoveu um efeito de barreira frente as condições adversas simuladas.

A presença de alimentos e ingredientes alimentícios melhora a viabilidade de micro-organismos durante o trânsito gástrico, o mecanismo proposto para este efeito benéfico está no aumento do pH do conteúdo gástrico resultante da presença do alimento. Alimentos com alto conteúdo gordura e a presença de certas proteínas podem proteger as bactérias da acidez estomacal e assim aumentar a sobrevivência do trânsito gástrico (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2012).

Frutanos como a inulina, que na matriz alimentar se liga a água disponível e forma um gel constituído de uma rede de partículas cristalinas, pode exercer um efeito protetor como ingrediente alimentar prebiótico, melhorando a sobrevivência e atividade de bactérias probióticas durante o armazenamento de alimentos probióticos, assim como a passagem pelo SGI (BURITI, CASTRO, SAAD, 2010a). Outros ingredientes como CPS podem apresentar efeito protetor similar, aumentando a conservação durante a vida de prateleira e a resistência frente a mudanças no pH e enzimas secretadas durante a passagem ao SGI (AKALIN *et al.*, 2007).

3.3.3 Características sanitárias

A avaliação microbiológica quanto ao aspecto sanitário da sobremesa está apresentada na TABELA 5.2, com resultados de $<10 \text{ UFC.g}^{-1}$ para coliformes a 45°C e *B. cereus* e ausência de *Salmonella sp.* em 25g de amostra, no primeiro e vigésimo oitavo dia de armazenamento.

TABELA 5.2 – AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA QUANTO AO ASPECTO SANITÁRIO DA SOBREMESA

Micro-organismos	Tempo de armazenamento (dias)		Padrão microbiológico*
	1	28	
Coliformes a 45°C (UFC.g^{-1})	<10	<10	10 UFC.g^{-1}
<i>Salmonella sp.</i>	Ausência em 25g	Ausência em 25g	Ausência em 25g
<i>Bacillus cereus</i> ($<\text{UFC.g}^{-1}$)	<10	<10	$5 \times 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$

*NOTA: Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001)

Após os dados obtidos terem sido comparados com os parâmetros estabelecidos, para produtos a base de soja, pela Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 que estabelece o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos” (BRASIL, 2001) a sobremesa aerada desenvolvida está de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente.

Aragon-Alegro *et al.* (2007) observaram, após 14 e 21 dias de estocagem refrigerada, a presença de bolores e leveduras em *mousse* de chocolate probiótico e simbiótico, respectivamente. Da mesma forma, Buriti, Castro e Saad (2010b) encontraram uma população acima de $5 \times 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$ de bolores e leveduras em *mousse* de goiaba simbiótico com 28 dias de refrigeração. Portanto, é possível concluir que o conservante empregado e as condições higiênico-sanitárias do processamento e armazenamento foram fatores determinantes para a manutenção da qualidade microbiológica do produto durante 28 dias de estocagem.

3.4 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

3.4.1 Características físico-químicas

As características físico-químicas avaliadas nas sobremesas, durante o período de armazenamento refrigerado, estão apresentadas na TABELA 5.3.

Para as amostras de sobremesa aerada, a firmeza variou apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos, ocorrendo aumento ao longo do tempo. Quanto à A_w , que indica quanto de água livre há no sistema, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados. Os valores de pH obtidos, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de 14 e 21 dias. Quanto à acidez total, somente o tempo de 7 dias apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) durante o período de armazenamento sob refrigeração.

TABELA 5.3 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS APRESENTADAS PELA SOBREMESA DURANTE PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

Tempo de armazenamento (dias)	Firmeza (N)	A_w	pH	Acidez total (g.L ⁻¹)
1	1,84 ^b ± 0,03	0,97 ^a ± 0,00	5,03 ^a ± 0,01	9,90 ^b ± 0,17
7	2,14 ^a ± 0,08	0,97 ^a ± 0,00	5,05 ^b ± 0,02	11,40 ^a ± 0,07
14	2,09 ^a ± 0,06	0,97 ^a ± 0,00	5,01 ^{bc} ± 0,02	9,37 ^b ± 0,28
21	1,91 ^b ± 0,09	0,96 ^a ± 0,00	5,00 ^{bc} ± 0,01	9,53 ^b ± 0,20
28	1,99 ^{ab} ± 0,08	0,97 ^a ± 0,01	5,09 ^c ± 0,01	9,37 ^b ± 0,12

NOTA: Letras diferentes, na mesma coluna, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de Tukey)

A firmeza é definida como a força requerida para comprimir uma substância entre a língua e o palato, e fisicamente é conceituada como a força máxima necessária para comprimir uma amostra (CARDARELLI *et al.*, 2008). O aumento dos valores deste parâmetro pode ser devido à desidratação superficial da sobremesa, ocorrida durante o armazenamento refrigerado. Cardarelli *et al.* (2008) obtiveram uma variação de 2,29 a 5,24N para *mousse* simbiótico de chocolate, para 28 dias de armazenamento refrigerado, e sugerem este aumento a uma interação entre os ingredientes da formulação durante o tempo de armazenamento. Buriti, Castro e Saad (2010b) encontraram valores para a firmeza de 2,97 a 3,33 N, durante 28 dias de refrigeração, em *mousse* simbiótico de goiaba.

A ausência de variação significativa para a A_w nas amostras de sobremesas, estão de acordo com o encontrado por Aragon-Alegro *et al.* (2007), que obtiveram valores de A_w entre 0,98-0,97, sem apresentar diferenças significativas ($p < 0,05$).

O pH ótimo para o crescimento da maioria das bactérias está próximo do neutro, sendo suprimido em valores de pH abaixo de 5,00 (BERESFORD *et al.*, 2001). Buriti, Komatsu e Saad (2007) obtiveram pH de 5,00, após 21 dias de estocagem, em *mousse* preparado com polpa integral de maracujá e inulina adicionado da cepa *Lb. acidophilus* La-5. O CPS, componente da formulação da sobremesa aerada desenvolvida neste trabalho, pode ter influenciado nos valores obtidos para o pH, pois de acordo com Antunes, Cazetto e Bolini (2005) o CPS pode aumentar a capacidade tamponante de produtos lácteos, devido ao seu conteúdo de proteína e grupamentos fosfato.

A acidez apresentou redução de 5,35% durante o período de armazenamento. Este aspecto pode estar relacionado à fraca capacidade de acidificação encontrada para a cepa *P. acidilactici* B14 (item 3.3.2, Cap. III), presente na cultura associada. Para Buriti, Komatsu e Saad (2007) alguns possíveis compostos presentes em suco e polpa de maracujá podem estar envolvidos na inibição do crescimento de *Lb. acidophilus*, como ácido ascórbico, carotenóides, compostos aromáticos (tióis, terpenos, alcoóis) e ésteres de ácidos graxos como butanoato de etila, hexanoato de etila e butanoato de hexila.

3.4.2 Características cromáticas

A aparência de um produto consiste de sua estrutura visual, textura, distribuição de cor na superfície e brilho e, portanto, pode ser considerada, um dos muitos fatores que determina a compra e o consumo regular (GRANATO, 2009).

A cor dos alimentos é um parâmetro de consideração quando um produto é desenvolvido devido ao seu impacto na aceitabilidade inicial dos consumidores potenciais (RIZZO; MURATORE, 2009).

A TABELA 5.4 demonstra as características cromáticas da sobremesa apresentadas durante o tempo de estocagem.

A luminosidade (L^*) obtida para as amostras variou de 88,91 a 80,22, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos, exceto para 7 e 21

dias. O parâmetro a^* apresentou resultados variando de 0,83 a 1,07, sem variação significativa ($p < 0,05$) durante o período de estocagem, da mesma forma o parâmetro b^* não apresentaram variação significativa ($p < 0,05$) durante o período de estocagem. As medidas de tonalidade (*Hue*) e intensidade da cor (Croma), também não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) durante o tempo de estocagem.

TABELA 5.4 – CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DA SOBREMESA DURANTE O TEMPO DE ESTOCAGEM

Tempo de armazenamento (dias)	L^*	a^*	b^*	<i>Hue</i> (°)	Croma
1	88,91 ^a ±1,14	0,90 ^a ±0,06	23,53 ^a ±0,58	87,81 ^a ±0,17	23,55 ^a ±0,58
7	81,22 ^{bc} ±2,16	1,03 ^a ±0,18	19,77 ^a ±2,12	87,04 ^a ±0,20	19,79 ^a ±2,12
14	80,02 ^c ±3,07	0,83 ^a ±0,21	19,61 ^a ±2,59	87,51 ^a ±0,85	19,63 ^a ±2,58
21	82,94 ^{bc} ±0,90	0,87 ^a ±0,10	20,23 ^a ±0,25	87,54 ^a ±0,31	20,25 ^a ±0,24
28	86,57 ^{ab} ±1,34	1,07 ^a ±0,11	19,78 ^a ±0,45	86,91 ^a ±0,29	19,81 ^a ±0,45

NOTA: Letras diferentes, na mesma coluna, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) (Pós-teste de *Tukey*)

As características de cor de um alimento estão diretamente ligadas a sua composição química, ou seja, aos componentes da sua formulação. Assim como, as condições de processamento a que é submetido, ao tipo de embalagem empregada e a forma de conservação durante seu período de estocagem.

A luminosidade (L^*), que varia de 100 para branco e 0 para preto, apresentou resultados que indicaram que a sobremesa possuía coloração clara, assim como o b^* com valores de 19,61 a 23,53, com características para a coloração amarela.

O ângulo *Hue*, apresentou valores de 86,91 a 87,81°, estando próximo de 90,0° indicado como valor representativo da tonalidade amarela. A variação apresentada para este parâmetro (ΔHue), durante 28 dias de armazenamento foi de 0,9, sendo imperceptível ao olho humano, pois somente são detectadas variações na tonalidade acima de 2,5 (ALMEIDA, 2004).

O parâmetro ΔE^*_{ab} que indica a diferença de sensação na tonalidade da cor, incluindo brilho, tom e saturação, calculado para o intervalo de 28 dias de armazenamento sob refrigeração foi de 4,42. Este valor global representa a perda das características cromáticas iniciais do produto, decorrente de possíveis reações bioquímicas ocorridas durante o período de estocagem.

A cromaticidade da sobremesa está relacionada aos seus componentes coloridos e reações de degradação (suco de maracujá), as etapas de processamento que podem comprometer a cor (tratamento térmico e aeração) e

conservação. A coloração do suco de maracujá se deve a um complexo de pigmentos carotenóides, no qual predomina o β -caroteno. Os carotenóides são compostos lipossolúveis moderadamente estáveis ao calor e sujeitos à perda de cor por oxidação, a degradação do β -caroteno é esperada quando o produto é submetido a tratamento térmico e longo tempo de estocagem (SARON *et al.*, 2007).

A vitamina C, presente no maracujá em concentração de 156 mg.Kg^{-1} , pode estar tanto na forma de ácido ascórbico, quanto ácido deidroascórbico e é susceptível a degradação enzimática sendo formados pigmentos escuros (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

3.4.3 Características da composição de isoflavonas

Com objetivo de avaliar a composição de isoflavonas assim como a atividade das BAL da cultura associada sobre estes compostos, foi determinada a composição no extrato de soja utilizado e nas amostras de sobremesa, como apresenta a TABELA 5.5.

O extrato de soja empregado no desenvolvimento da sobremesa aerada era proveniente de grãos inteiros (conforme informação do fabricante), com concentração total de $1632,90 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de isoflavonas, distribuídas em 54,30% genisteína e isômeros e 45,70% referentes à daidzeína e seus isômeros

O teor total de isoflavonas obtido foi de 55,80, 55,00, 56,40, 63,80 e 47,00 mg.Kg^{-1} para as sobremesas com 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração, respectivamente. As amostras de sobremesa não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de 1 a 14 dias, porém as amostras de 21 e 28 dias foram estatisticamente diferentes.

A sobremesa desenvolvida apresentou uma redução no teor total de isoflavonas de 96,09 a 97,18%, quando comparadas com o extrato de soja em pó utilizado.

O valor total teórico de isoflavonas era de 84,80 mg em 1Kg de sobremesa, calculado a partir do extrato aquoso de soja na concentração de 15,5 % (p/p), empregado na proporção de 33,5% (p/p) na formulação da sobremesa. Entretanto, os valores obtidos para as amostras armazenadas por 28 dias apresentaram uma

diminuição de 21,00 a 37,80 mg.Kg⁻¹, para a sobremesa controle o resultado obtido estava próximo do esperado para o teórico.

TABELA 5.5 COMPOSIÇÃO DE ISOFLAVONAS NO EXTRATO DE SOJA E NA SOBREMESA

Isoflavona (mg.Kg ⁻¹)	Extrato de soja em pó	Sobremesa Controle	Tempo de armazenamento (dias)				
			1	7	14	21	28
Daidzina	342,60±1,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glicitina	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Genistina	333,60±0,60	71,00±0,30	44,50 ^b ±0,70	43,60 ^b ±0,50	44,90 ^b ±0,30	50,60 ^a ±0,40	37,70 ^c ±0,50
Malonil-daidzina	306,70±0,70	4,10± 0,20	ND	ND	ND	ND	ND
Malonil-glicitina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Malonil-genistina	374,90±0,80	14,70±0,10	11,30 ^b ±0,10	11,40 ^b ±0,30	11,50 ^b ±0,00	13,20 ^a ±0,10	9,30 ^c ±0,00
Acetil-daidzina	76,9±0,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetil-glicitina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetil-genistina	101,30±0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Daidzeína	20,40 ±0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gliciteína	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Genisteína	76,40± 0,20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	1632,90±3,70	89,80±0,50	55,80^b±0,80	55,00^b±0,70	56,40^b±0,50	63,80^a±0,40	47,00^c±0,50

NOTA: *ND – não detectado; Letras diferentes, entre as colunas, apresentam diferença significativa (p<0,05) (Pós-teste de Tukey);

Góes-Favoni *et al.* (2004) encontraram um teor de isoflavonas totais de 2929,50 mg.Kg⁻¹ para extrato de soja em pó proveniente de grãos descascados, sendo 44,47% representado pela daidzeína e derivados e 55,52% pela genisteína e seus isômeros. O extrato de soja utilizado neste trabalho apresentou um valor 44,26% inferior para isoflavonas totais, porém com distribuição de isômeros semelhante, ao apresentado pela literatura.

Para Moraes *et al.* (2009) as concentrações de isoflavonas nos grãos são afetadas por fatores genéticos e ambientais como o tipo de cultivar, local de plantio, clima, ano da safra, tipo de solo e as interações entre estes fatores. Os processos empregados na obtenção de derivados de soja muitas vezes afetam as características do produto acabado, inclusive de alguns componentes que definem as suas propriedades profiláticas e terapêuticas, como é o caso das isoflavonas (ROSSI *et al.*, 2004).

A diminuição do total de isoflavonas da sobremesa, em relação ao extrato de soja em pó, pode ser decorrente do tratamento térmico aplicado e da diluição desta concentração com os demais ingredientes que compõem a formulação. Segundo Whang e Murphy (1994) a adição de outras matérias-primas que não contém isoflavonas na formulação dos alimentos, provoca a diluição destas, diminuindo sua concentração. Rossi *et al.* (2011) obtiveram para “iogurte” de soja uma redução de

92% na concentração de isoflavonas, em relação ao grão integral, devido as etapas do processamento e, principalmente, do fator de diluição empregado na obtenção do “leite”.

A variação, apresentada entre as sobremesas armazenadas e controle, pode ser proveniente das condições do tratamento térmico empregado, pois as sobremesas mantidas sob refrigeração foram obtidas de um mesmo lote distinto da amostra controle. Segundo Goes-Favoni *et al.* (2004) a presença e a concentração das isoflavonas nos produtos à base de soja dependem das condições de processamento, principalmente a temperatura de tratamento do material.

As isoflavonas ocorrem na soja na forma de β -glicosídeos, as quais são menos estrogênicas que suas formas agliconas. Portanto, necessitam ser hidrolisadas pela ação da β -glucosidase produzida por bactérias intestinais, para liberar a forma aglicona que estará disponível para ser absorvida. Alguns micro-organismos possuem atividade de β -glucosidase, a qual pode hidrolisar a forma glicosilada em agliconas no extrato aquoso de soja fermentado (CAVALLINI *et al.*, 2010). Algumas BAL probióticas têm a habilidade de bioconverter à forma glicosilada das isoflavonas em suas respectivas agliconas sem a necessidade de suplementação (VIJ; HATI; YADAV, 2011).

Como na sobremesa com soja aerada não foi observada a presença da forma aglicona, proveniente do extrato de soja ou da hidrólise enzimática dos β -glicosídeos presentes, pode ser considerado que não houve atividade da enzima β -glucosidase. Entretanto, a ausência desta atividade enzimática não pode ser atribuída à incapacidade das BAL da cultura associada em produzir esta enzima. Mas, ao fato de que a sobremesa com soja aerada em estudo não é um produto fermentado, ou seja, esta matriz alimentar é somente um veículo para ingredientes funcionais e micro-organismos potencialmente probióticos.

3.5 ROTULAGEM NUTRICIONAL

A elaboração da rotulagem nutricional da sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica foi realizada de acordo com a Resolução RDC nº 360 de

23 de dezembro de 2003 da ANVISA, que estabelece o “Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados” (BRASIL, 2003b).

Foi considerado que para comercialização a porção de 120g da sobremesa poderá ser dividida em duas embalagens com 60 g cada. Portanto, a descrição da informação nutricional foi calculada para 1 pote de 60 gramas.

Na TABELA 5.6, está apresentada na formatação obrigatória para a rotulagem nutricional, é verificado que a sobremesa obtida apresentou valor calórico de 91 Kcal, o que representa 4,5% dos valores diários recomendados. Ausência de gorduras *trans* e teor de fibra alimentar que corresponde a 6,0% dos valores diários. Quanto aos minerais, a concentração de sódio que é de 33 mg, representa somente 1,3% do valor diário recomendado.

TABELA 5.6 – INFORMAÇÃO NUTRICIONAL DA SOBREMESA COM SOJA AERADA POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
60g (1 POTE)*		
QUANTIDADE POR PORÇÃO		% VD**
Valor energético	91 Kcal = 387 KJ	4,5
Carboidratos	15g	4,8
Proteínas	3g	4,4
Gorduras totais	2g	4,0
Gorduras saturadas	1g	5,9
Gorduras <i>trans</i>	0g	***
Fibra alimentar	1g	6,0
Sódio	33mg	1,3
Cálcio	86mg	8,5
Fósforo	46mg	6,5

*Porção de referência de 120g; ** Valores diários de referência com base em uma dieta de 2.000 Kcal ou 8.400 KJ; ***Valores diários não estabelecidos

Quando comparados os resultados obtidos com um produto comercializado como sobremesa láctea aerada com cobertura de geléia de morango, foi verificado um aumento para o produto comercial de 40, 43 e 30% para o valor calórico, teor de sódio e gorduras totais, respectivamente.

Os resultados obtidos para a sobremesa desenvolvida, ao serem comparados com uma sobremesa de soja cremosa sabor chocolate (produto comercial) apresentaram 10 e 29% de aumento para o valor calórico e de sódio, respectivamente. Entretanto, foi verificada uma redução de 12% para o teor de gorduras saturadas na sobremesa com soja aerada.

3.6 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

Características como viabilidade durante o processamento e armazenamento de forma que o produto probiótico apresente vida média, variando de 15 a 30 dias, e propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e textura) aceitáveis (SACCARO, 2008) são de fundamental importância para que um alimento probiótico ou simbiótico possa ser aceito pelos consumidores. Portanto, a avaliação sensorial de um produto com características inovadoras é de fundamental importância para avaliação da sua qualidade global.

Com o objetivo de avaliar uma eventual alteração sensorial durante o período de estocagem decorrente da atividade metabólica da cultura associada, as amostras submetidas à avaliação sensorial foram de 1 e 28 dias de armazenamento refrigerado.

A TABELA 5.7, apresenta os resultados obtidos para a análise sensorial da sobremesa com soja aerada, potencialmente simbiótica.

O atributo acidez foi avaliado pelo método de comparação pareada, em que os provadores indicaram entre as sobremesas (1 e 28 dias) qual era mais ácida. O resultado obtido não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas sobremesas, portanto, os julgadores não detectaram diferença entre as amostras de 1 e 28 dias. Da mesma forma, foi solicitado aos julgadores que fosse nominada a amostra preferida e os resultados indicaram que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as sobremesas de 1 e 28 dias de armazenamento refrigerado.

Quanto à aceitabilidade, embora com valores indicando maior aceitação para a amostra de 28 dias, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

TABELA 5.7 – ANÁLISE SENSORIAL DA SOBREMESA COM SOJA AERADA, POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA

Tempo de armazenamento (dias)	Acidez* (%)	Preferência** (%)	Aceitabilidade***
1	49 ^a	41 ^a	4,94 ^a ±1,34
28	51 ^a	59 ^a	5,20 ^a ±1,05

Letras iguais na mesma coluna, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), $n=100$. * Pós-teste Monocaudal, ** Pós-teste Bicaudal e *** Pós-teste de Tukey

A distribuição das notas dos julgadores para a aceitabilidade está apresentada no GRÁFICO 5.4.

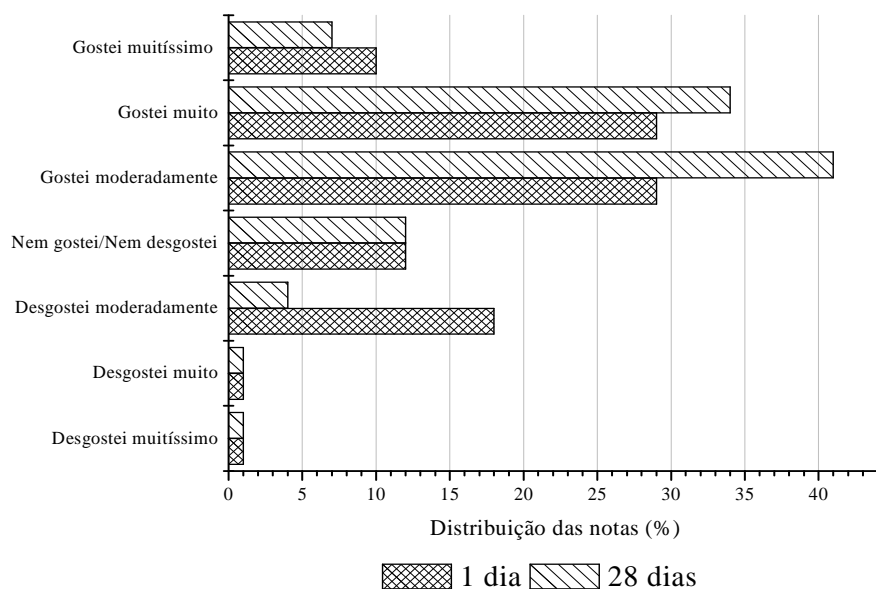


GRÁFICO 5.4 – DISTRIBUIÇÃO DAS NOTAS DOS JULGADORES PARA A ACEITABILIDADE

As notas da amostra de 28 dias estão distribuídas na sua maioria nos itens gostei moderadamente e gostei muito, com 41 e 34% dos provadores, respectivamente. Para a sobremesa com 1 dia as notas gostei moderadamente e gostei muito obtiveram a mesma distribuição de 29% dos provadores.

Com os resultados obtidos da avaliação sensorial, é possível considerar que durante os 28 dias de armazenamento refrigerado a sobremesa com soja aerada, potencialmente simbiótica, permaneceu estável para os atributos avaliados.

3.7 ESTIMATIVA DE CUSTO

O custo final estimado para fabricação da sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica, assim como, o preço de venda no atacado e varejo estão apresentados na TABELA 5.8.

A planilha com a descrição detalhada dos custos estimados (no Apêndice 9) foi elaborada considerando o valor de 120g como a porção unitária do produto, apresentada na forma de conjunto com 2 unidades de 60 gramas.

O custo unitário de fabricação foi de R\$ 1,41, considerando as matérias-primas utilizadas, embalagens primárias (embalagem plástica termoformada e alumínio para vedação) e secundárias (embalagem cartonada e de papelão). Quando foram considerados os custos indiretos, ou seja, operacionais o valor obtido foi de R\$ 2,12.

Para o preço de venda no atacado, foi considerada uma margem de lucro de 50% sobre o custo final do produto (valor estabelecido pela planilha da indústria) que foi de R \$ 3,18 e para o preço de venda no varejo foi utilizado também 50% de lucro.

Portanto, o preço de venda calculado para o varejo foi de R\$ 4,76/120g de produto, estando este valor similar à faixa de preços das sobremesas lácteas aeradas comerciais/convencionais, que variam em média de R\$ 5,87/180g a R\$ 4,48/150g.

TABELA 5.8 – DESCRIÇÃO DOS CUSTOS ESTIMADOS PARA FABRICAÇÃO DA SOBREMESA

Descrição dos custos	Valor final (R\$)
Custo da matéria-prima por unidade de produto	1,35
Custo da embalagem por unidade de produto	0,06
Custo de fabricação por unidade de produto	1,41
Custos indiretos para fabricação (50% sobre o custo de fabricação)	0,71
<i>Custo final de fabricação por unidade de produto</i>	<i>2,12</i>
Lucro da indústria (50% do custo final)	1,06
<i>Preço de venda para atacado</i>	<i>3,18</i>
Lucro do varejo (50% do preço do atacado)	1,59
<i>Preço de venda no varejo</i>	<i>4,76</i>

Segundo De Barcellos *et al.* (2009) com alta tecnologia agregada, os produtos funcionais se diferenciam dos alimentos convencionais em características, benefícios e muitas vezes preço, embora visualmente possam se assemelhar com o correspondente convencional.

De acordo com Pozzo (2012) em pesquisa realizada em três países europeus (Finlândia, França e Suécia) foi verificado que, indivíduos com mais de 40 anos constituíram o principal grupo de consumo para alimentos funcionais e com pré-disposição a pagar mais por tais alimentos. Ares, Gámbaro e Giménez (2009) observaram uma propensão das mulheres no que tange à receptividade aos

produtos funcionais. Honkanen e Frewer (2009) identificaram em análise realizada na Rússia, que indivíduos mais receptivos a alimentos funcionais tendem a ser mais velhos, mulheres e com maior poder aquisitivo, reforçando as tendências já ressaltadas anteriormente.

O conhecimento a respeito dos alimentos funcionais ainda é limitado, mesmo em países como Canadá, Estados Unidos e França, onde o movimento de alimentos funcionais é mais desenvolvido que em outras regiões (POZZO, 2012).

O Brasil encontra-se na categoria de mercados emergentes que constituem grande potencial de crescimento, porém carente de informações e aprofundamento. Com necessidade de pesquisas de consumo em âmbito nacional, que poderão servir de base para a criação de estratégias por parte da indústria, a fim de garantir competitividade a partir do conhecimento das necessidades do consumidor deste segmento (BARCELLOS, 2009).

Em pesquisa nacional denominada o “Perfil de Consumo de Alimentos no Brasil”, promovida pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP) em parceria com o Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE), foi verificado forte potencial de crescimento para alimentos que podem trazer algum benefício à saúde, devido a 21% dos consumidores apresentaram tendência de consumo para alimentos associados a “saudabilidade e bem estar”, quanto ao conhecimento de alimentos funcionais, 30% dos consumidores conhece bem e 51% acredita totalmente que alimentos funcionais podem trazer benefícios à saúde (FIESP/IBOPE, 2010).

4 CONCLUSÕES

A aplicação da cultura associada, na matriz alimentar desenvolvida, apresentou resultados para viabilidade de 9,82 a 9,26 log UFC.120g⁻¹ durante o tempo de armazenamento, portanto, adequado a legislação vigente.

Quanto a resistência ao trânsito no TGI em pH 2,0 e 4,0 a presença da matriz alimentar aumentou em 10,0 e 5,68%, respectivamente, a viabilidade da cultura associada quando comparada com a sua forma livre. Estes resultados favoráveis, para a manutenção da população de micro-organismos probióticos, estão fortemente relacionados com a composição química e a estrutura física da matriz escolhida como barreira protetora no TGI.

Quanto à estabilidade, da sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica, durante a vida de prateleira, foi verificada a presença de coalescência nas bolhas do sistema aerado para a sobremesa de 28 dias de armazenamento. Nos aspectos físico-químicos avaliados se destacam o teor de isoflavonas, que apresentou uma redução média de 96,63% em relação ao extrato de soja em pó utilizado e a ausência de formação de moléculas de agliconas.

A informação nutricional para a porção de 60g da sobremesa apresentou 91 Kcal, 1g para gorduras saturadas e fibra alimentar e 33mg de sódio.

As sobremesas de 1 e 28 dias de armazenamento se apresentaram adequadas, segundo a legislação vigente, quanto ao aspecto sanitário e sem diferença significativa para o atributo acidez, a aceitabilidade e preferência.

O custo final estimado para fabricação foi de R\$ 2,12/120g e o preço de venda no varejo foi de R\$ 4,78/120g.

Para o desenvolvimento de alimentos funcionais, destacando probiótico e/ou simbiótico, é necessário tempo para que a investigação seja realizada por testes *in vitro* e *in vivo*, para garantir o aspecto funcional, além da seleção da matriz alimentar ideal para determinada linhagem probiótica e público alvo.

Portanto, embora o segmento de alimentos funcionais esteja em franca expansão, no Brasil e no mundo, o desenvolvimento de tais produtos não caminha na mesma velocidade, devido às barreiras técnicas relacionadas com a garantia da identidade e qualidade do produto.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, A.S.; GÖNÇ, S.; ÜNAL, G.; FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, v.72, p.M222-M227, 2007.
- ALMEIDA, D. **Fisiologia das alterações da cor: percepções e medição da cor**. Aulas de fisiologia pós-colheita, 2004. Disponível em: <http://dalmeida.com/poscolheita/cor1.pdf>> Acesso em: 02/05/2012.
- ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003. 135p.
- ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic microorganisms during storage, post-acidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.169-173, 2005.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.C.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v.40, p.669-675, 2007.
- ARES, G.; GÁMBARO, A.; GIMÉNEZ, A. Consumer perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts: influence of ingredient, ingredient name and health claim. **Food Quality and Preference**, v.20, p.50-56, 2009.
- BARCELLOS, M.D. de. O processo decisório de compra de alimentos funcionais: uma pesquisa sobre as motivações, atitudes e intenções de consumo no Brasil. **Projeto Universal (CNPQ)**. Porto Alegre, 2009.
- BENTO, O.P. **Alimentos funcionais – um mercado em expansão?**, 2009. Disponível em: <http://dzoo.uevora.pt>> Acesso em: 09/02/2013.
- BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p.259-274, 2001.
- BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 388, de 05 de agosto de 1999. Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 19- sobremesas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 ago. de 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 91, 18 de outubro de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimento com soja. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 out. de 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. de 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. de 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. de 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão técnico-científica de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 24/05/2011.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C; SAAD, S.M.I. Synbiotic potencial of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v.104, p.1605-1610, 2007.

BURITI, F.C.A.; KOMATSU, T.R.; SAAD, S.M.I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.325-317, 2007.

BURITI, F.C.A. **Sobremesa aerada simbiótica: desenvolvimento do produto e resistência do probiótico *in vitro***. 144 fls. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.121-129, 2010a.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of synbiotic guava mousses. **Food Chemistry**, v.123, p.1190-1197, 2010b.

CAMPBELL, G.M.; MOUGEOT, E. Creation and characterisation of aerated food products. **Trend in Food Science & Technology**, v.10, p.283-296, 1999.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocultivação**, v.1, p.18-24, 2001.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. **Food Research International**, v.39, p. 203-211 2006.

CARDARELLI, H.R.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CASTRO, I.A. de; SAAD, S.M.I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.1318-1324, 2008.

CAVALLINI, D.C.U.; ROSELINO, M.N.; MANZONI, M.S.J.; SYLOS, C.M.de; ROSSI, E.A. Isoflavones supplementation of a probiotic fermented soy product: effects on quality characteristics and isoflavones profile. **Alimentos e Nutrição**, v.21, p.175-182, 2010.

CHAMPGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: Editora UFLA, 2005.

COWARD L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Amercian Journal do Clinical Nutrition**, v.68, p.1486S-1491S, 1998.

CRUZ, A G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v.42, p.1233-1239, 2009.

DEL BARCELLOS, M.D.; AGUIAR, L.K.; FERREIRA, G.C.; VIEIRA, L.M. Willingness to try innovative food products: a comparison between british and brazilian consumers. **Brazilian Administration Review**, v.6, p. 50-61, 2009.

FERNÁNDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.449-455, 2003.

FERREIRA, V. L.; ALMEIDA, T. C. A.; PETTINELLI, M. L. C. V.; DA SILVA, M. A. A. P.; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. M. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: Profíqua, 2000.

FIESP/IBOPE. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo/ Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística. **Pesquisa nacional sobre o perfil de consumo de alimentos no Brasil**, 2010. Disponível em: [http<www.abic.com.br>](http://www.abic.com.br) Acesso em: 12/02/2013.

FOLEGATTI, M.I.da S. **Estudo do efeito do uso de diferentes agentes aerantes e gelificantes e do processamento nas características físicas e sensoriais e na estabilidade do produto mousse de maracujá**. s/f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

FRANCO R.C. **Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais**. 167 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Aplicada) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GÓEZ-FAVONI, S.P.; BELÉIA, A.D.P.; CARRÃO-PANIZZI M.C.; MANDARINO, J.M.G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.582-586, 2004.

GRANATO, D. **Emulsão de soja e goiaba: caracterização físico-química, cromática, sensorial e de estabilidade**. 183 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

GRIMOUD, J.; DURAND, H.; COURTIN, C.; MONSAN, P.; OUARNÉ, F.; THEODOROU, V.; ROQUES, C. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosacharides to select effective synbiotics. **Anaerobe**, v.16, p.493-500, 2010.

HONKANEN, P.; FREWER, L. Russian consumers: motive for food choice. **Appetite**, v.55, p. 363-371, 2009.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico químicos para análise de alimentos**. 4.ed. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IKEDA, A.A.; MORAES, A.; MESQUITA, G. Considerações sobre tendências e oportunidades dos alimentos funcionais. **Pesquisa & Desenvolvimento em Engenharia de Produção**, v.8, p. 40-56, 2010.

JAYAMANNE, V.S.; ADAMS, M.R. Determination of survival, identity, and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.189-194, 2006.

KRÜGER, R.; KEMPKA, A.P.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R.L.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.19, p.43-53, 2008.

MARINOVA, K.; BASHEVA, E.; NENOVA, B.; TEMELSKA, M.; MIRAREFI, A.Y.; CAMPBELL, B.; IVANOV, I.B. Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: sodium caseinate na whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1864-1876, 2009.

MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V.; LOPES, F.C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**, v.79, p.119-127, 2012.

MONTEAGUDO-MERA, A. RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; FERRERO, M.A. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v.4, p.531-541, 2012.

MORAES, C.S.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H.; PARK, Y.K. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2009.

MÜLLER-FISCHER, N.; WINDHAB, E.J. Influence of process parameters on microstructure of food foam whipped in a rotor-stator device within a wide static pressure range. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.263, p.353-362, 2005.

OHATA, S.M.; ZACARCHENCO, P.B.; AULER, F.; ANTUNES, A.J. Adição de concentrado protéico de soro (CPS) em *mousse* de maracujá. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.7, p.53-66, 2005.

OLIVEIRA, R.P.S.; FLORENCE, A.C.R.; SILVA, R.C.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.467-472, 2009.

PERES, C.M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – with na emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v.36, p.31-42, 2012.

POZZO, D.N. O perfil do consumidor de alimentos funcionais: um estudo bibliográfico das tendências mundiais. **Cadeia Produtiva**, v.1. p.1-15, 2012.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v.43, p.1-7, 2010.

RIZZO, V.; MURATORE, G. Effects of packaging on shelf life of fresh celery. **Journal of Food Engineering**, v.90, p.124-128, 2009.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. The potencial effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT- Food Science Technology**, v. 44, p.100-108, 2011.

ROSSI, E.A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A.R.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; ABDALLA, D.S.P.; TALARICO, V.H.; MINTO, D.F. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p.93-99, 2004.

ROSSI, E.A.; CAVALLINI, D.C.U.; MANZONI, M.S.J.; ROSSI, P.R. Produtos probióticos e prebióticos à base de soja. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G. da; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound-assited extraction of soy isoflavonas. **Journal of Chromatography A**, v.1012, p.119-128, 2003.

SACCARO, D.M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SARON, E.S.; DANTAS, S.T.; MENEZES, H.C. de; SOARES, B.M.C.; NUNES, M.F. Estabilidade sensorial de suco de maracujá pronto para beber acondicionado em latas de aço. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 772-778, 2007.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W.H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v.15, p.1289-1297, 2005.

SHAH, N.P.; ALI, J.F.; RAVULA, R.R. Populations of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, and *Lactobacillus casei* in commercial fermented milk products. **Bioscience of Microbiota**, v.19, p.35-39, 2000.

SILVA, D.J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa:UFV Imprensa Universitária, 1981.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2010.

STANNER, S. Healthy ageing: the role of nutrition. **Nursing & Residential Care**, v.11, p.239-242, 2009.

STEFE, C. de A.; ALVES, M.A.R.; RIBEIRO, R.L. Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.3, p.16-33, 2008.

TALWALKAR, A.; MILLER, C.W.; KALLASAPATHY, K.; NGUYEN, M.H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.605-611, 2004.

VIJ, S.; HATI, S.; YADAV, D. Biofunctionality of probiotic soy yoghurt. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.502-509, 2011.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1666-1673, 1994.

WILDE, P.J.; SARKER, D.K. Enhancement of bubble surface elasticity by crosslinking agents and their effects on protein foam stability. In: CAMPBELL, G.M.; WEBB, C.; PANDIELLA, S.S.; NIRANJAN, K. (eds.). **Bubbles in food**. Saint Paul: Eagan Press, 1999.

YANG, X.; FOEGEDING, E.A.; The stability and physical properties of egg white and whey protein foams explained based on microstructure and interfacial properties. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1687-1701, 2011.

ZUÑIGA, R.N.; AGUILERA, J.M. Aerated food gels: fabrication and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p.176-187, 2008.

CAPÍTULO VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

1 CONCLUSÕES

Dos 10 tipos de matérias-primas de origem vegetal utilizadas, foram obtidos 63 cultivos ao todo, sendo 13 selecionados como bactérias ácido lácticas.

Das 13 linhagens selecionadas, 8 foram definidas por pesquisa presuntiva como enterococos e portadoras de atividade β -hemolítica, sendo desconsideradas para a pesquisa. As 4 culturas restantes apresentaram características que possibilitam a utilização, na forma associada, em processamento de alimentos de origem animal e vegetal, mas apenas 3 foram definidas como *Pediococcus acidilacti*;

A cepa de *Pediococcus acidilactici* com 96,35% de confirmação com o banco de sequencias ribossomais, apresentou potencial probiótico. Entre as características estão ser proveniente de origem vegetal segura, viabilidade de 44,49% em condição de pH ácido e de 70,80% em concentrações fisiológicas de sais biliares (0,3%), tolerância para 5 dos 11 compostos antimicrobianos testados, satisfatório antagonismo frente aos patógenos *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Escherichia coli* ATCC 25922 e índice de sobrevivência de 65,82 e 97,45% quando submetida ao sistema gastrointestinal em pH 2,0 e 4,0, respectivamente.

Quando associada com a cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, apresentou melhora no desempenho do crescimento celular quando comparada as culturas isoladas, produtividade em ácido láctico de 0,416 g.L⁻¹.h⁻¹ e resistência ao sistema gastrointestinal em pH 2,0 e 4,0 de 57,28 e 92,39%, respectivamente.

A cultura associada, potencialmente probiótica, ao ser veiculada em uma sobremesa com soja aerada prebiótica deu origem a sobremesa com soja aerada, potencialmente simbiótica.

Quanto à estabilidade, da sobremesa com soja aerada potencialmente simbiótica, durante a vida de prateleira foram obtidos resultados positivos tanto na sua viabilidade durante o tempo de armazenamento refrigerado permitindo o produto estar adequado a legislação vigente (9,82 a 9,26 log UFC.120g⁻¹), quanto na resistência ao trânsito no trato gastrointestinal que aumentou em 10,0% (pH2,0) e

5,68% (pH4,0) quando comparado com a cultura associada, na forma isolada (não incorporada ao alimento), quando submetida às mesmas condições.

Foi observada coalescência nas bolhas do sistema aerado com 28 dias de armazenamento refrigerado, porém não houve comprometimento na estrutura aerada.

Quanto ao aspecto sanitário, físico-químico e sensorial não foram observadas alterações que modificassem de forma a comprometer a qualidade global do produto.

As características nutricionais indicaram um produto com 91 Kcal, 1g de gorduras saturadas e 33mg de sódio, na porção de 60g (porção de 120g distribuída em 2 unidades de 60g).

O custo final estimado para fabricação do produto foi de R\$2,12, podendo ser comercializado no atacado e varejo com preço de R\$3,18 e R\$4,76, respectivamente.

As respostas obtidas de experimentos realizados *in vitro*, são indicativo da potencialidade de uma linhagem em apresentar propriedades probióticas. Somente depois de realizados inúmeros testes *in vivo* é que um micro-organismo pode ser considerado probiótico.

Quanto ao desenvolvimento de alimentos probióticos e/ou simbióticos é de fundamental importância considerar a interação entre o micro-organismo e a matriz alimentar, pois a funcionalidade deste alimento é dependente da manutenção da viabilidade celular da linhagem probiótica e esta, do efeito protetor que a matriz alimentar, com suas características químicas e físicas, exerce durante o armazenamento e trânsito gastrointestinal.

O desempenho dos alimentos probióticos e/ou simbióticos está diretamente relacionado com a linhagem probiótica utilizada e a matriz alimentar selecionada, não sendo passível de generalizações quanto à espécie ou gêneros de micro-organismos e classes de alimentos utilizados como matrizes.

Embora o segmento de alimentos funcionais esteja em franca expansão, no Brasil e no mundo, o desenvolvimento de tais produtos não caminha na mesma velocidade. Isto porque a pesquisa e desenvolvimento destes alimentos, destacando os simbióticos, probióticos e prebióticos, demanda de exaustiva investigação que

deve ser realizada com extremo rigor para a obtenção da funcionalidade, estabilidade e sensorialidade desejadas.

2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Isolamento de novas linhagens de bactérias ácido lácticas

- Novas matérias-primas de origem vegetal, espécies típicas da região sul do Brasil.

Avaliação de propriedades probióticas

- Aplicar novas metodologias *in vitro* para traçar um perfil mais completo das cepas de interesse.
- Investigar detalhadamente as linhagens B16 e B17 do *Pediococcus acidilactici*.
- Avaliar a produção de bacteriocinas no *Pediococcus acidilactici* B14.
- Planejar ensaios *in vivo* para as cepas com maior destaque quando avaliadas *in vitro*.

Desenvolvimento de novos produtos probióticos e simbióticos

- Aplicação do *Pediococcus acidilactici* B14 isolado em uma matriz alimentar.
- Novos produtos com soja.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia
Departamento de Engenharia de Alimentos
Fone(0XX42)3220-3269 Fax(0XX42)2203072

Ponta Grossa, 06 de Dezembro de 2011

RELATÓRIO DE ANÁLISE- 219/11

Solicitante: Maria Carolina de Oliveira Ribeiro

Endereço: Rua Francisco Ribas, 735 – Jardim Carvalho - Ponta Grossa

Fone: (0xx42) 3220-3843

Amostra: amostra de sobremesa láctea à base de soja

Data da Recepção: 16/11/2011

Determinações solicitadas: Umidade, Cinzas, Proteínas, Fibra alimentar, Gorduras totais, Carboidratos, Valor calórico, Teor de sódio, Teor de cálcio, Teor de fósforo, Teor de potássio

Resultados:

A(s) amostra(s) fornecida(s) apresentou a composição expressa na Tabela abaixo:

Tabela 1- Composição da amostra em massa úmida

DETERMINAÇÃO	Sobremesa
Umidade (%)	63,0
Cinzas (%)	1,0
Proteínas (%)	5,5
Fibra alimentar (%)	2,5
Gorduras totais (%)	3,7
Carboidratos (%)*	24,3
Valor calórico (Kcal) **	152,5
Teor de sódio (mg %)	55
Teor de cálcio (mg %)	143
Teor de fósforo (mg %)	76,2
Teor de potássio (mg%)	168

*calculado por diferença **calculado

Nota Importante

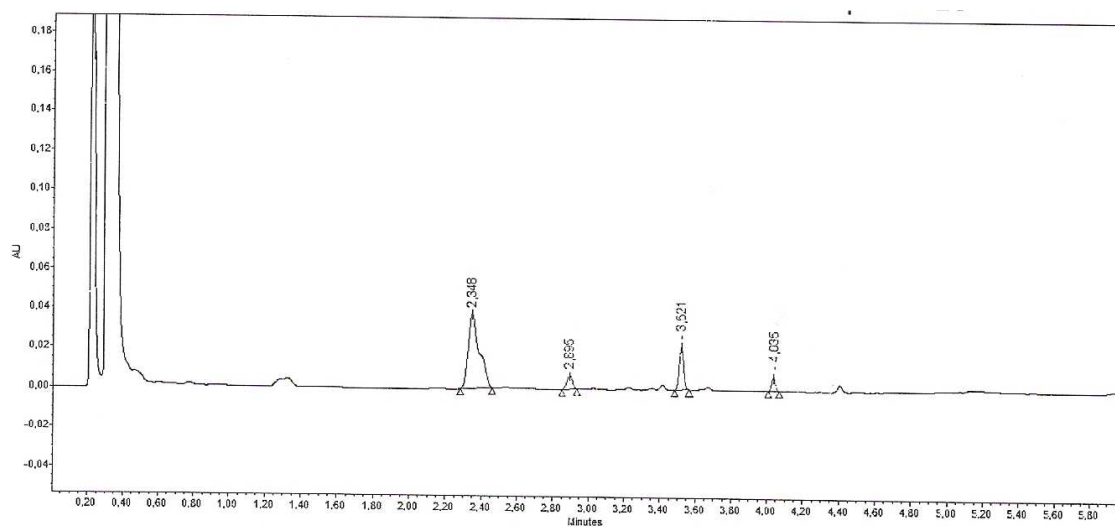
Os resultados deste ensaio têm significado restrito e se aplicam tão somente à amostra trazida pelo interessado.

ANEXO 4

APÊNDICES

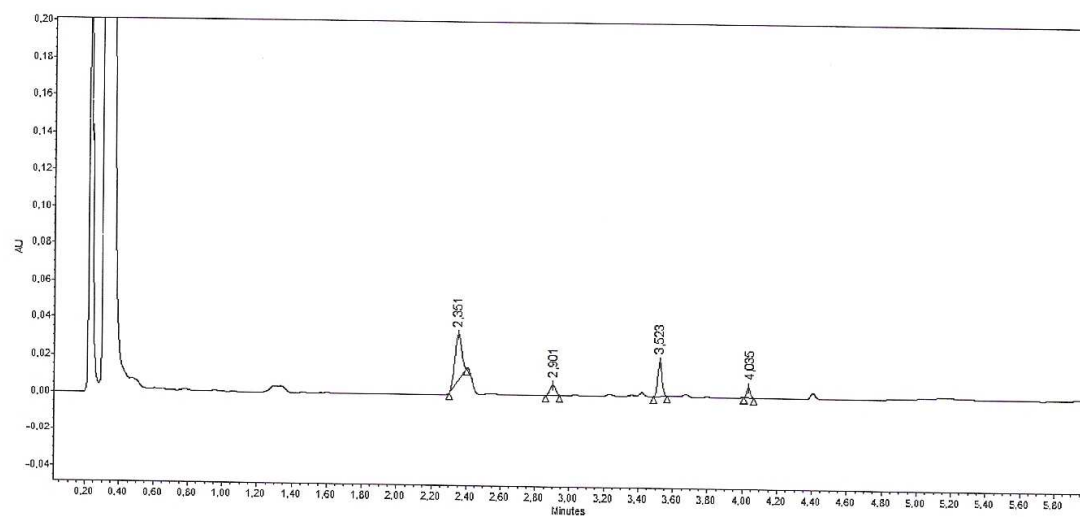
APÊNDICE 1

CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS DA AMOSTRA DE 1 DIA DE ARMAENAMENTO REFRIGERADO POR UPLC



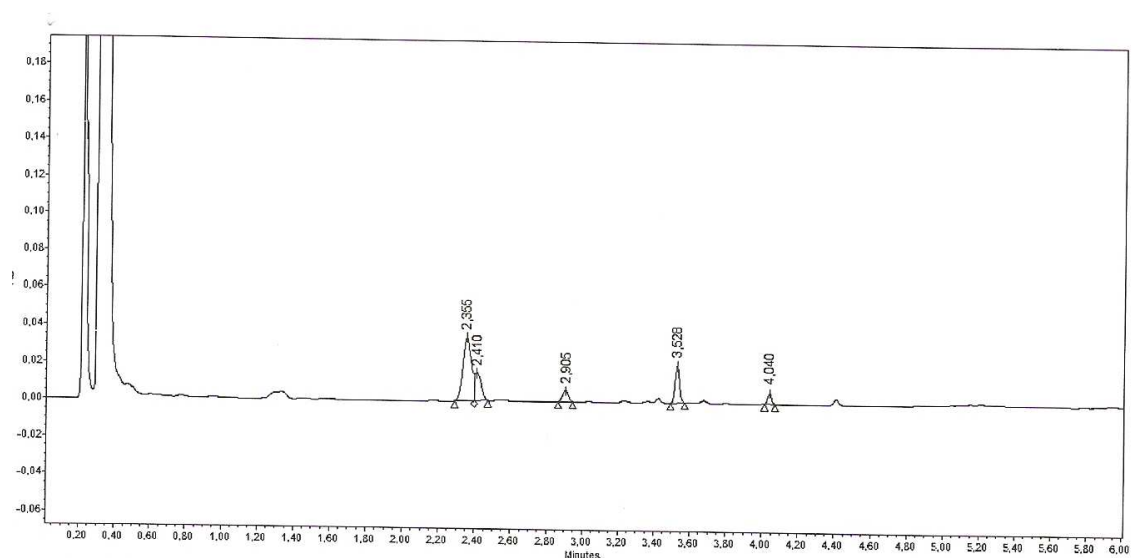
APÊNDICE 2

CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS DA AMOSTRA DE 7 DIAS DE ARMAENAMENTO REFRIGERADO POR UPLC



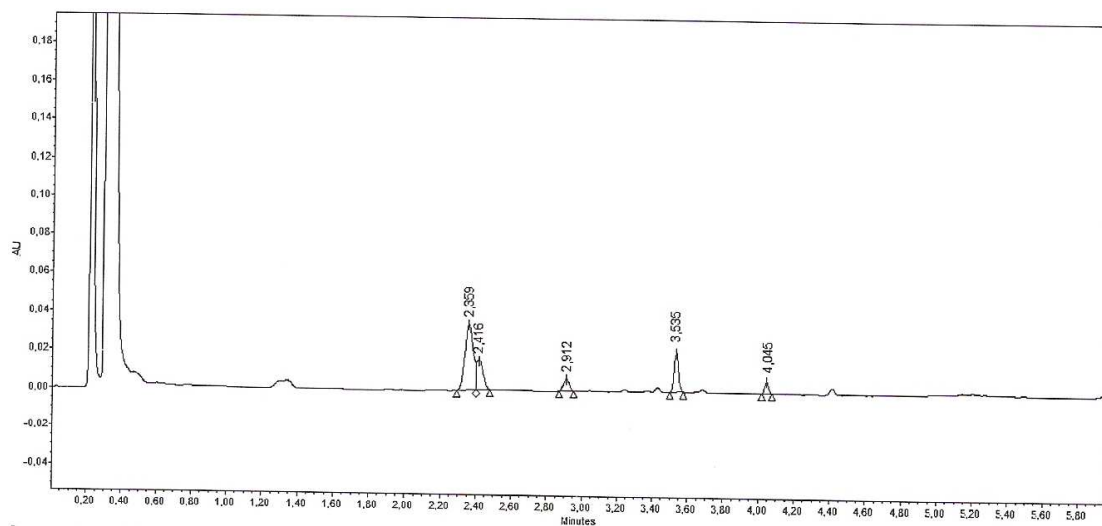
APÊNDICE 3

CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS DA AMOSTRA DE 14 DIAS DE ARMAENAMENTO REFRIGERADO POR UPLC



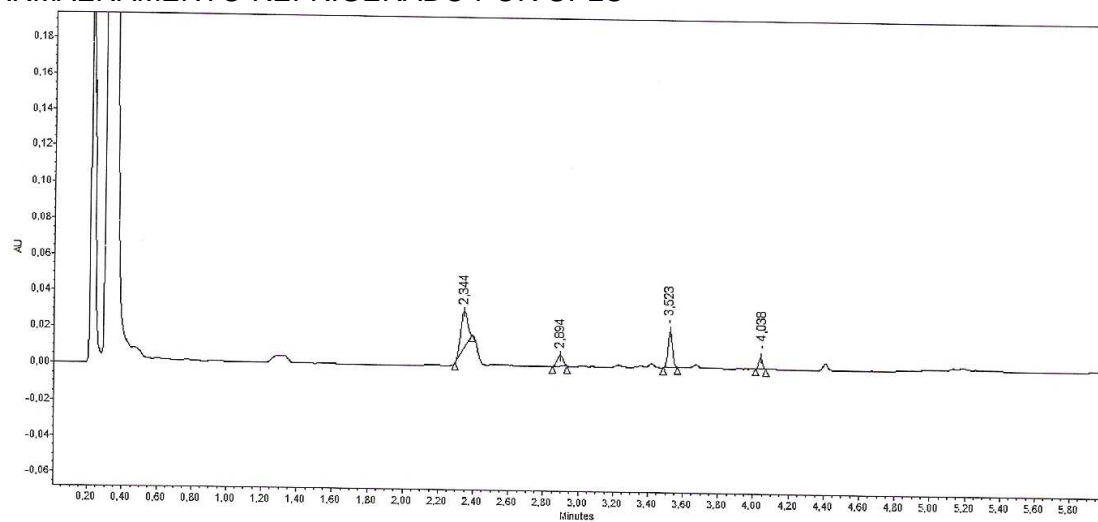
APÊNDICE 4

CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS DA AMOSTRA DE 21 DIAS DE ARMAENAMENTO REFRIGERADO POR UPLC



APÊNDICE 5

CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE ISOFLAVONAS DA AMOSTRA DE 28 DIAS DE ARMAENAMENTO REFRIGERADO POR UPLC



APÊNDICE 6

Ficha de Avaliação Preliminar

Nome: _____ Data: _____
Sexo: () F () M Faixa etária: () < 25 () 25-35 () 36-50 () > 50

Você tem hábito de consumir musse?

() Sim () Não

Se sua resposta for sim, por favor, assinale com que frequência acontece o consumo.

() uma vez na semana

() mais que uma vez no mês

() uma vez no mês

() a cada dois meses

Você consome alimentos a base de soja? () Sim () Não

Quais? _____

Se sua resposta for sim, por favor, assinale com que frequência acontece o consumo.

() mais que uma vez na semana

() uma vez na semana

() mais que uma vez no mês

() uma vez no mês

Teste de Comparação Pareada

Você recebeu duas amostras codificadas. Por favor, prove as sobremesas da esquerda para a direita e circule o código da amostra MAIS ÁCIDA.

AMOSTRA A

AMOSTRA B

Por favor, agora circule o código da amostra que você PREFERE.

AMOSTRA A

AMOSTRA B

Existe algum tipo de sabor residual nas amostras provadas? () Sim. Qual? _____ () Não

Observações

Teste de Aceitabilidade

Por favor, avalie as amostras de musse que você recebeu e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou do produto.

7-Gostei muitíssimo

6-Gostei muito

5-Gostei moderadamente

Código da amostra: _____ Nota: _____

4-Nem gostei/nem desgostei

Código da amostra: _____ Nota: _____

3-Desgostei moderadamente

2-Desgostei muito

1-Desgostei muitíssimo

Agradecemos a sua participação!

APÊNDICE 7

Questionário de Recrutamento

Este questionário tem como objetivo recrutar provadores para análise sensorial de sobremesa aerada (musse) simbiótica (probiótico+ prébiotico) a base de soja, esta avaliação foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) com o Parecer N°128/2011.

Nome: _____

Telefones _____ para
contato: _____ email: _____

Escolaridade:

- () 1º grau incompleto
- () 1º grau completo
- () 2º grau incompleto
- () 2º grau completo
- () 3º grau incompleto
- () 3º grau completo

Você tem alergia ou intolerância a algum tipo de alimento? Qual?

Você rejeita algum alimento? Quais?

Você é capaz de citar alimentos que sejam ácidos? Por favor, cite três exemplos.

Especifique os alimentos que você não pode comer ou beber por razões de saúde. Explique, por favor.

Gostaríamos que você registrasse se apresenta algum tipo de problema abaixo relacionado:

Resfriado freqüente	()	Sim	()	Não
Dor de cabeça frequente	()	Sim	()	Não
Congestão nasal	()	Sim	()	Não
Alergia	()	Sim	()	Não
Uso contínuo de medicamentos	()	Sim	()	Não
Diabetes	()	Sim	()	Não
Hipertensão	()	Sim	()	Não
Fumante	()	Sim	()	Não

Agradecemos a sua participação!

APÊNDICE 8

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ CAMPUS PONTA GROSSA

Av. Monteiro Lobato - Km 04 – Jardim Pitangui - Fone (42) 32204823
CEP 84016-210 – Ponta Grossa - Paraná

O (a) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa que eu, Maria Carolina de Oliveira Ribeiro (UTFPR) realizarei, com a orientação da professora Dra. Luciana Porto de Souza Vandenbergue (UFPR) e co-orientação da professora Dra. Michele Rigon Spier (UFPR), para conclusão de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Paraná – UFPR, com o título “Aplicação de cultura associada de *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 em sobremesa aerada simbiótica a base de soja”.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a utilização de bactérias lácticas em sobremesa aerada (musse) simbiótica a base de soja por métodos sensoriais de aceitação e comparação. Para tanto, necessito da sua colaboração participando das seguintes etapas:

Primeira etapa: todos os candidatos serão entrevistados para avaliar alguns fatores que possam impedir a participação na pesquisa.

Segunda etapa: os selecionados serão familiarizados com a sobremesa, as fichas e a forma de avaliar os produtos que receberão na sequência.

Terceira etapa: aos participantes será entregue duas amostras e será solicitado que sejam comparadas e avaliadas quanto à acidez, preferência e possível presença de sabor residual.

Quarta etapa: aos provadores será solicitado que as amostras sejam avaliadas quanto à aceitação.

Considera-se que a pesquisa é segura à sua saúde, por ser um produto que é submetido à pasteurização, adicionado de conservante e mantido sob refrigeração. Caso ocorra alguma alergia ou problema gastrointestinal, deve-se entrar em contato com o responsável pela pesquisa, e o serviço de atendimento médico de urgência (Serviço Médico-UTFPR) será acionado.

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e isenta de qualquer despesa, bem como não será disponibilizada nenhuma compensação financeira ao participante.

Informo que o (a) Sr. (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas sobre a pesquisa e que não serão divulgadas identificações de nenhum participante. Comprometo-me a utilizar os dados coletados apenas para pesquisa científica, sem nunca tornar possível a sua identificação.

Em caso de reclamações ou quaisquer dúvidas contatar a secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa pelo fone (42) 3220-3108 ou e-mail: seccoep@uepg.br. Av. Carlos Cavalcanti, 4778. Bloco M, sala 12. Uvaranas. Ponta Grossa – PR – Brasil.

Caso concorde em participar, por favor, preencha seu nome e complete os dados.

Pelo presente documento, eu _____, portador do RG nº _____, autorizo que sejam usadas minhas respostas na referida avaliação, para a realização do trabalho de conclusão de doutorado em Processos Biotecnológicos, na UFPR, da acadêmica Maria Carolina de Oliveira Ribeiro. Certifico também ter recebido uma cópia deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Ponta Grossa, ____ de _____ de 2012.

Equipe da Pesquisa

Responsável pela pesquisa - Luciana Porto de Souza Vandenbergue

Contato: lucianapsv@gmail.com ou (41)33613697
Pesquisadora participante - Michele Rigon Spier

Contato: spier@ufpr.br ou (41)33613271
Pesquisadora participante - Maria Carolina de Oliveira Ribeiro

Contato: carolina@utfpr.edu.br ou (42) 32204823

APÊNDICE 9

PLANILHA PARA ESTIMATIVA DE CUSTO DO PRODUTO FINAL

Para a construção desta planilha foi considerado como base de cálculo a produção de 1.000 conjuntos de 120g (0,12Kg) (composto por 2 unidades de 60g), portanto a quantidade de produto final (Q_{PF}) considerada foi de 120 Kg.

A quantidade teórica (Q_T) foi obtida considerando a formulação da sobremesa aerada (Cap. V – TABELA 5.1), o valor unitário (V_U) foi obtido do comércio local e por empresas de exportação (considerando as marcas utilizadas no desenvolvimento da sobremesa – Cap. V) e os itens do valor total (V_T) e valor unitário do produto (V_{UP}) pelas EQUAÇÕES 5.10 e 5.11.

Item	Unidade	Q_T (Kg)	V_U (R\$.Kg ⁻¹)	V_T (R\$)	V_{UP} (R\$)
Matéria-prima*					
Extrato de soja em pó	Kg	12,46	19,96	248,62	0,249
Polpa integral de maracujá	Kg	24,00	14,90	375,60	0,358
Creme de leite	Kg	22,20	7,50	166,50	0,167
Açúcar refinado	Kg	13,20	3,42	45,14	0,045
Leite em pó desnatado	Kg	4,12	15,50	63,86	0,064
Fermento	Kg	0,18	135,00	24,30	0,024
Inulina	Kg	3,00	42,00	126,00	0,126
Oligofrutose	Kg	3,00	14,00	42,00	0,042
Agente emulsificante	Kg	2,40	24,00	71,88	0,072
Gelatina em pó	Kg	1,50	116,25	174,38	0,174
Xarope de glicose de milho	Kg	1,52	15,68	23,83	0,024
Concentrado proteico de soro	Kg	1,20	5,80	6,96	0,007
Sorbato de potássio	Kg	0,084	29,00	2,44	0,002
<i>Custo da matéria-prima por unidade de produto</i>					<i>R\$ 1,35</i>
Embalagem					
Chapa/embalagem plástica	Kg	9,00	4,05	36,45	0,036
Alumínio para vedação	Kg	0,94	29,15	11,66	0,012
Caixa papelão	un	40,00	0,25	9,92	0,010
<i>Custo da embalagem por unidade de produto</i>					<i>R\$ 0,06</i>
Custo de fabricação por unidade de produto					R\$ 1,41
Custos indiretos para fabricação (50% sobre o custo de fabricação)					R\$ 0,71
Custo final de fabricação por unidade de produto					R\$ 2,12
Lucro da indústria (50% do custo final)					R\$ 1,06
Preço de venda para atacado					R\$ 3,18
Lucro do varejo (50% do preço do atacado)					R\$ 1,59
Preço de venda no varejo					R\$ 4,76

*Custo da cultura lática está dividido nos custos de extrato de soja em pó, fermento e xarope de glicose de milho (conforme formulação proposta Cap. V);